KOMPARTMENTIERUNG IM ENERGIESTOFFWECHSEL; BEZIEHUNG ZWISCHEN MITOCHONDRIALEM UND ZYTOSOLISCHEM ATP-SYSTEM

Dr. rer. nat. Sibylle Soboll

1981
T

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Sies

KOMPARTMENTIERUNG IM ENERGIESTOFFWECHSEL; BEZIEHUNG ZWISCHEN MITOCHONDRIALEM UND ZYTOSOLISCHEM ATP-SYSTEM.

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi an der
Universität Düsseldorf
für das Fach Physiologische Chemie

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Sibylle Soboll
Düsseldorf 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Material und Methoden	9
2.1	Tierhaltung und Organentnahme	9
2.2	Hämoglobinfreie Leberperfusion	9
2.3	Herzperfusion	11
2.4	Kultivierung von Rattenherzfibroblasten	12
2.5	Isolierung von Leberzellen	12
2.6	Fraktionierung von Gewebe und Zellen in nicht-wässrigen Medien	13
2.7	Herstellung der Extrakte und analytische Verfahren	16
2.8.1	Berechnung der Metabolitgehalte in Mitochondrien und Zytosol	17
2.8.2	Bildung der Mittelwerte der Enzym- und Metabolitverteilung in mehreren Einzelgradienten	25
2.8.3	Berechnung der mitochondrialen und zytosolischen Konzentrationen der Metabolite aus den Gehalten in Mitochondrien und Zytosol	27
2.9	Fraktionierung der Hepatozyten mit Digitonin	29
2.10	Isolation von Mitochondrien aus Rattenleber	30
3.	Resultate	31
3.1	Zuverlässigkeit der Methode	31
3.1.1	Extrahierbarkeit der Substrate	31
3.1.2	Aktivitätsverlust der Enzyme	31

		Seite
3.1.3	Genauigkeit der Extrapolation	34
3.1.4	Verunreinigung durch andere Kompartimente	35
3.2	Hämoglobinfreie Leberperfusion, Beschreibung des Stoffwechselzustandes	39
3.3	Verteilung der Adeninnukleotide und des Phosphats	47
3.4	Konzentrationsgradienten mitochondrial/zytosolisch von Di- und Tricarbonsäuren und Δ pH über die Mitochondrienmembran	52
3.5	Subzelluläre ATP- und ADP-Gehalte in isolierten Hepatozyten	56
3.6	Subzelluläre ATP- und ADP-Konzentrationen in der Leber in vivo	57
3.7	Subzelluläre ATP/ADP-Quotienten im Herzen	60
4.	Diskussion	63
4.1	Das experimentelle Modell	63
4.2	Subzelluläre Adeninnukleotidverteilung in Beziehung zu ATP-Synthese und -Verbrauch	68
4.2.1	Zytosolische Adeninnukleotide	68
4.2.1.1	Regulation der Glykolyse	68
4.2.1.2	Adenylatkinasegleichgewicht	71
4.2.2	Mitochondriale ATP/ADP-Quotienten	73
4.2.3	Wechselwirkung zwischen mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten	78
4.3.1	pH-Gradient über die Mitochondrienmembran und seine Beziehung zur Protonmotive Force	84
4.3.2	Verteilung von Di- und Tricarbonsäuren nach dem pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran	85

		Seite
4.4	Störung des Energiestoffwechsels durch freie Fettsäuren	89
4.5	Subzelluläre Phosphorylierungspotentiale des ATP	95
4.6	Regulation der Atmung; thermodynamische Atmungskontrolle	98
4.7	Unterschiede im subzellulären Energiestoffwechsel zwischen isolierten Hepatozyten, perfundierter Leber und Leber in vivo	106
5.	Zusammenfassung	110
	Literatur	114
	Danksagung	123

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0087

1. Einleitung und Fragestellung.

ATP spielt die zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle, da es die "universelle Währung" im zellulären Stoffwechsel darstellt. Für diese Rolle eignet es sich besonders gut, denn es nimmt mit seiner freien Hydrolyseenergie eine Mittelstellung in der Reihe der energiereichen Verbindungen ein. So kann es einerseits in der Hexokinasereaktion Glukose durch Phosphorylierung aktivieren, während andererseits ADP durch Kreatinphosphat in der Kreatinkinasereaktion oder durch Phosphoenolpyruvat in der Pyruvatkinasereaktion wieder phosphoryliert werden kann. Als Maß für den energetischen Zustand, die "phosphorylierende Kraft" einer Zelle gilt daher das Phosphorylierungspotential des ATP

$$\Delta G_{ATP} = \Delta G_o + RT \ln [ATP] / [ADP] \times [P]$$

und die Kenntnis der Konzentrationen von ATP, ADP und Phosphat ermöglicht die Berechnung des Phosphorylierungspotentials der Zelle.

Die Zelle besteht aus mehreren Kompartimenten, deren wichtigste, zumindest für den Energiestoffwechsel, das mitochondriale und das zytosolische Kompartiment sind. Die Mitochondrien werden auch als "Kraftwerk der Zelle" bezeichnet, da in der mitochondrialen Atmungskette der größte Teil des von der Zelle benötigten ATP synthetisiert wird. Es wäre jedoch falsch, anzunehmen, daß im Zytosol nur ATP gespalten wird, vielmehr kann im Stoffwechselweg der Glykolyse bei Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese kompensatorisch ein beachtlicher Teil

des gesamten ATP-Bedarfs der Zelle gedeckt werden (siehe 4.1.2). In Skelettmuskelzellen deckt die Glykolyse sogar den größten Teil des Energiebedarfs ab. Dennoch kann man generell sagen, daß der größte Teil des zellulären ATP im Zytosol in biosynthetischen Prozessen, zur Aufrechterhaltung von Ionengradienten oder bei der Kontraktion von Muskelfasern verbraucht wird, während die Mitochondrien vorwiegend die Aufgabe des Endabbaus der Stoffwechselprodukte und der Neusynthese von ATP haben. Aus diesen verschiedenen Aufgaben ergibt sich die Notwendigkeit verschiedener Phosphorylierungspotentiale in beiden Räumen. Die Mitochondrien können nur bei einem nicht zu hohen Potential optimal arbeiten, da sonst zuviel Energie aufgewendet werden müßte, um neues ATP zu synthetisieren. Das Phänomen der "Atmungskontrolle", d.h. der Kontrolle der Aktivität der mitochondrialen Atmung durch das Phosphorylierungspotential ist von den Arbeitsgruppen um Chance (Chance & Williams, 1956) und Bücher (Bücher & Klingenberg, 1958) ausführlich untersucht und charakterisiert worden. Für das Zytosol ist es zweckmäßig, daß bei der Spaltung von ATP möglichst viel Energie verfügbar wird, also im zytosolischen Komprtiment ein höheres Phosphorylierungspotential vorliegt. Durch Trennung kataboler und anaboler Stoffwechselwege in zwei Kompartimente hat die Zelle die Möglichkeit, Reaktionen auf verschiedenen Energieniveaus gleichzeitig ablaufen zu lassen. Die Frage ist, wie die Wechselwirkung zwischen zytosolischem und mitochondrialem Phosphorylierungspotential zustande kommt. Die innere Mitochondrienmembran ist für

mehrfach geladene Moleküle wie z.B. ATP^{4-} und ADP^{3-} impermeabel, so daß der Austausch durch ein spezifisches Transportsystem erfolgen muß. Als sich vor etwa 20 Jahren in Sardinien die Kinder einer Schulklasse bei einem Ausflug durch das Kauen einer süßlich schmeckenden Wurzel vergifteten, begann man die Wirkstoffe dieser Pflanze, der Distel Atractylis gummifera, im Tierexperiment zu untersuchen. Man fand heraus, daß ein Wirkstoff, Atraktylosid, eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs am ganzen Tier verursachte (Santi, 1958). Anschließende Untersuchungen an isolierten Mitochondrien ließen eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung vermuten. Es stellte sich jedoch heraus, daß nicht die mitochondriale ATP-Synthese als solche, sondern der vorgeschaltete Transport der Adeninnukleotide über die Mitochondrienmembran durch Atraktylosid gehemmt wird. Durch biochemische Anlayse dieses pflanzentoxikologischen Problems gelang somit der Nachweis der Existenz des ATP, ADP-Austauschproteins (Klingenberg & Pfaff, 1966, Duée & Vignais, 1965). Man fand heraus, daß der Adeninnukleotidtranslokator selektiv ATP ins Zytosol pumpte und ADP in die Mitochondrien (Pfaff & Klingenberg, 1968). Der asymmetrische Adeninnukleotidtransport verbraucht Energie und bewirkt, daß der extramitochondriale ATP/ADP-Quotient höher ist als der mitochondriale (Heldt et al., 1972).

Etwa im selben Zeitraum entstand die chemiosmotische Hypothese der Energiekonversion (Mitchell, 1961), die postulierte, daß bei der Oxidation von Substratwasserstoff

in der mitochondrialen Atmungskette Protonen ins Zytosol gepumpt werden, wodurch die mitochondriale Matrix alkalisch und negativ geladen gegenüber dem Zytosol wird. Die Existenz eines elektrischen Potentials und eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran wurde in mehreren Laboratorien an isolierten Mitochondrien bestätigt (Mitchell & Moyle, 1969, Nicholls, 1974, Padan & Rottenberg, 1973). Man bestimmte ein Membranpotential von etwa 120-140 mV und einen pH-Gradienten von 0.3-1.0 pH-Einheiten über die innere Mitochondrienmembran (Tabelle 1).

Tabelle 1: Δ pH, Protonenpotential ($\Delta\mu H^+$), Membranpotential ($\Delta\psi$) und Protonmotive Force (Δp) über die innere Mitochondrienmembran in isolierten Mitochondrien.

$\Delta\mu H^+ = 2.3\ RT/F \cdot \Delta pH$; (2.3 RT/F = 61 mV bei 37°C): $\Delta p = \Delta\psi + \Delta\mu H^+$ (Rottenberg, 1975)

	$pH_{mit.} - pH_{zyt.}$	$\Delta\mu H^+$	$\Delta\psi$ (mV)	Δp	Referenz
State 3+	0.7	-43	- 130	- 173	Nicholls, 1974
	0.7	-43	- 145	- 188	Mitchell & Moyle, 1969
	0.3	-18	- 124	- 142	Padan & Rottenberg, 1973
State 4+	1.3	-79	- 150	- 229	Nicholls, 1974
	0.9	-55	- 169	- 224	Mitchell & Moyle, 1969
	0.4	-24	- 125	- 149	Padan & Rottenberg, 1973

+ Als "State 3" bezeichnet man die mitochondriale Atmung im aktiven Zustand (mit ADP) und als "State 4" die Atmung im kontrollierten Zustand (ohne ADP, Chance & Williams 1956)

Mitchell nannte die Summe aus Membranpotential und Protonengradient "Protonmotive Force" und postulierte, daß sie der primäre Energiespeicher der mitochondrialen Atmungskette ist. Ein Teil der Protonmotive Force würde nach Mitchell zur ATP-Synthese und zum ATP-Transport verwendet.

Durch den Adeninnukleotidtranslokator hat die Zelle eine Kontrollmöglichkeit über das mitochondriale und zytosolische Phosphorylierungspotential und damit den Energiestoffwechsel der Zelle. Der Zusammenhang aller drei Prozesse, Oxidation, ATP-Synthese und -Transport ist in Abb. 1 dargestellt. Wird viel Energie in der mitochondrialen Atmungskette frei, so ist die Protonmotive Force hoch und damit die treibende Kraft für ATP-Synthese und -Export. Dadurch wird das zytosolische Phosphorylierungspotential erhöht, bis das Energieaufkommen zum Austransport von ATP so groß wird, daß Synthese und Transport verlangsamt werden. Man kann sich daher, aufbauend auf den bestehenden Hypothesen, die Regulation der ATP-Synthese in der Atmungskette so vorstellen, daß sie nicht nur vom mitochondrialen, sondern auch vom zytosolischen Phosphorylierungspotential reguliert wird. Dem Adeninnukleotidtranslokator kommt damit eine zentrale Bedeutung zu. Hätte der Translokator nur eine geringe Kapazität und Effektivität im Vergleich zur mitochondrialen ATP-Synthese, so könnte er keine Anhebung des zytosolischen Phosphorylierungspotentials über das mitochondriale bewirken. Es setzte daher eine intensive Forschungstätigkeit ein, die zum Ziel hatte, die Beziehung

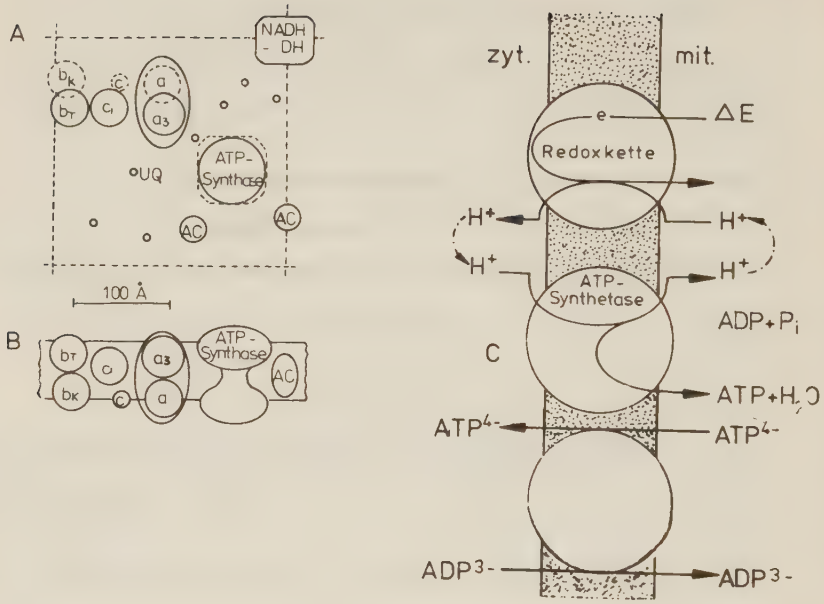


Abb. 1: Schematische Darstellung der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Membranproteine der inneren Mitochondrienmembran und der oxidativen Phosphorylierung.
b_K, b_T, c_1, c, a, a_3 sind Cytochrome;
UQ = Ubichinon, AC = Adeninnukleotidtranslokator, NADH-DH = NADH Dehydrogenase, modifiziert nach Klingenberg (1975).

zwischen ATP-Synthese in den Mitochondrien und ATP Verbrauch in beiden Kompartimenten z.B. in der Glukoneogenese oder der Harnstoffsynthese, und die Rolle des Adeninnukleotid-transportes bei der Regulation des Energiestoffwechsels zu klären.

Es wurden Untersuchungsmodelle von unterschiedlichem Grad der Komplexität benutzt. Das erste Modell geht von isolierten Mitochondrien, in Kombination mit extramitochondrialen, ATP verbrauchenden Systemen wie z.B. Kreatin + Kreatinkinase (Walter et al., 1974), ATPase, (Davis et al. 1975, Davis & Davis-van Thienen, 1978) oder Glukose + Hexokinase (Küster et al., 1976) aus, um Verhältnisse in der intakten Zelle zu simulieren. Das zweite Modell geht von isolierten Hepatozyten oder ganzen Organen (Leber, Herz, Skelettmuskel) aus. Durch die Entwicklung von Methoden zur Fraktionierung von isolierten Zellen (Zuurendonk & Tager, 1974) oder ganzen Organen (Elbers et al., 1974), die eine Veränderung des metabolischen Status während der Fraktionierung verhindern oder minimieren, besteht die Möglichkeit, mitochondriale und zytosolische Adeninnukleotidgehalte direkt zu bestimmen und zum Stoffwechselzustand der Zelle in Beziehung zu setzen. Vor Entwicklung dieser Fraktionierungstechniken wurde, ausgehend von Adeninnukleotidgehalten im ganzen Organ, versucht, mitochondriale und zytosolische Metabolitkonzentrationen zu berechnen (Veech et al., 1979, Seitz et al., 1977). Die "Metabolitindikatormethode" (Hohorst et al., 1961) ist von Krebs et al. (1969), Williamson et al. (1969) und Greenbaum et al. (1971) ausgearbeitet worden

und beruht auf dem Prinzip, daß bestimmte Enzyme auf Grund ihrer hohen Aktivität in der Zelle ein Reaktionsgleichgewicht einzustellen vermögen. Sofern diese Enzyme nur in einem Kompartiment lokalisiert sind, z.B. in den Mitochondrien oder im Zytosol, vermag man bei Kenntnis der Reaktionskonstante einer enzymatischen Reaktion aus gemessenen Zellgehalten der an dieser Reaktion beteiligten Metabolite deren mitochondriale und zytosolische Konzentrationen zu errechnen.

Die vorliegende Arbeit stützt sich auf direkte Messungen der Gehalte von Adeninnukleotiden und anderer für diese Fragestellung relevanter Metabolite, im mitochondrialen und extramitochondrialen Kompartiment der Zelle. Es wurden ganze Organe, wie Leber und Herz, aber auch isolierte Zellen, nach Frierstop gefriergetrocknet und in nichtwässrigen Medien aufgetrennt (Elbers et al., 1974). Anhand von Beobachtungen der Veränderung der Atmungsaktivität, der Geschwindigkeit der Glykolyse, Glukoneogenese, Harnstoffsynthese und mitochondrialen und zytosolischen Metabolitgehalten von Organen aus "quasi in vivo Systemen" oder Organen in vivo wird versucht, Rückschlüsse auf die Regulation des mitochondrialen und zytosolischen Energiestoffwechsels zu ziehen. Es wird gleichzeitig ein Überblick über die Resultate gegeben, die mit anderen Methoden erhalten wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Tierhaltung und Organentnahme.

Für die Experimente wurden männliche Albinoratten (Stamm Wistar, Gewicht 180-200 g) verwendet. Die Ratten erhielten Standarddiät (Fa. Altromin, Lage) und Wasser nach Belieben. Bei einigen Experimenten wurde ihnen 24 oder 48 Stunden vor Ausführung des Experiments die Nahrung entzogen. Zur Organentnahme wurden die Ratten entweder durch intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital (50 mg/kg) oder Ketamin (120 mg/kg) narkotisiert, oder mit dem Doppelbeil (Faupel et al., 1972) getötet. Die Organe wurden nach Wollenberger et al.,1960) friergestoppt.

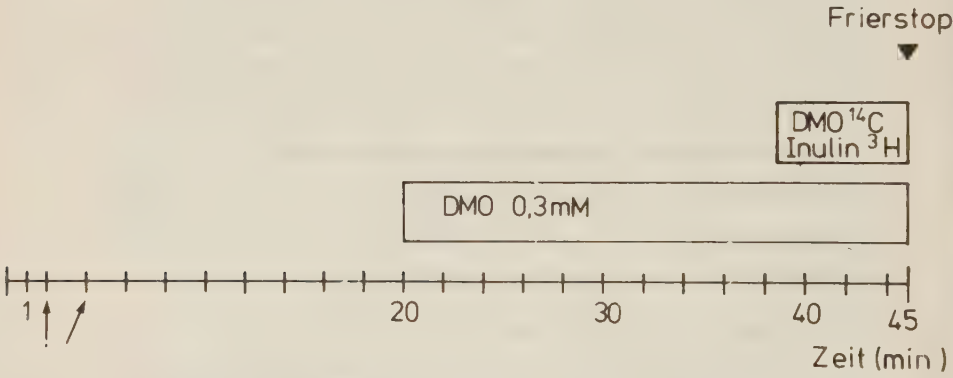
2.2 Hämoglobinfreie Leberperfusion.

Rattenlebern wurden im nicht-rezirkulierenden System (Scholz et al., 1973) mit Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer pH 7,4 (Krebs & Henseleit, 1932), perfundiert. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 4-5 ml/min x g Frischgewicht. Substrate wurden dem Perfusat mit Hilfe von Präzisionspumpen beigemischt. Im Perfusat wurden die Konzentrationen von Glukose, Laktat, Pyruvat, Hydroxybutyrat, Azetoazetat, (Bergmeyer, 1974) und Sauerstoff mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Das Experimentierschema ist in Abb. 2 dargestellt.

In Experimenten, in denen mitochondriale und zytosolische pH-Werte bestimmt werden sollten, wurde 20 min vor dem Frierstopp 0.3 mM DMO (5,5-Dimethyl-2,4 oxazolidindion)

Abb. 2:

Hämoglobinfreie Leberperfusion (Lebern gefütterter und gehungerter Ratten)



Perfusatanalysen (Laktat, Pyruvat, Glukose, ß-Hydroxybutyrat, Azetoazetat, Sauerstoff, ^{14}C-DMO, ^{3}H-Inulin)

und in den letzten 5 min 2-^{14}C-DMO, 0.1 µCi/ml, (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) infundiert. DMO ist eine schwache, nicht metabolisierbare Säure, die sowohl die Plasmamembran, als auch die innere Mitochondrienmembran permeieren kann und deren Anion DMO^- sich in den verschiedenen Räumen nach dem pH-Wert verteilt (Waddell & Butler, 1959).

$$\frac{1}{n} \lg \frac{[Anion^{n-}]_i}{[Anion^{n-}]_a} = \lg \frac{[H^+]_a}{[H^+]_i} = pH_i - pH_a \quad (I)$$

Zur Bestimmung des extrazellulären Raumes wurde 5 min vor Beendigung des Experimentes ^{3}H-Inulin 0.5 µCi/ml (New England Nuclear) infundiert (Abb.2). Die Leberperfusionen wurden von Prof.Dr.Roland Scholz, Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München, durchgeführt.

2.3 Präparation des isoliert perfundierten, arbeitenden Meerschweinchenherzens.

Herzen von gefütterten Meerschweinchen wurden isoliert (Bünger et al., 1975) und in einer anfänglichen Adaptationsperiode durch die Aorta perfundiert (Langendorff, 1895). Das Perfusionsmedium war Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer und enthielt zusätzlich 5 mM Pyruvat, oder 5 mM Glukose, 0.2 mM Pyruvat und 5 U/l Insulin. Ein arbeitendes Herz wurde dadurch erhalten, daß man den linken Vorhof mit einer nicht rezirkulierenden Perfusionsapparatur verband, wobei am Zufluß ein konstanter Druck eingestellt wurde (o.98-1.17 kPa und der linke Ventikel das Perfusat in einen vertikalen Überlaufzylinder mit einstellbarer Höhe pumpte (Bünger et al. 1979). Herzfrequenz, Herzminutenvolumen, koronare Durchflußgeschwindigkeit, mittlerer systolischer bzw. diastolischer Aortendruck und ventrikulärer Füllungsdruck wurden aufgezeichnet. Der Sauerstoffgehalt des Perfusionsmediums wurde mit einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Die Perfusion des arbeitenden Meerschweinchenherzens wurde von PD.Dr.Rolf

Bünger, Institut für Physiologie der Universität München, durchgeführt.

2.4 Kultivierung von Rattenherzfibroblasten

Durch Trypsinieren von Rattenherzen 1 - 5 Tage alter Ratten (Harary et al., 1974) erhält man eine Zellsuspension, die sowohl Fibroblastenzellen als auch Herzmuskelzellen enthält. Die Fibroblastenzellen wurden von den Herzmuskelzelllen nach Polinger (1970) getrennt und in 175 cm^2 Flaschen der Fa. Nunc in CMRL 1415 Medium pH 7.4 (Fa. Seromed, München), ohne Bicarbonat, ergänzt mit 10 % foetalem Kälberserum, kultiviert. Wenn die Zellen eine Dichte von etwa 10^5 Zellen/cm^2 erreicht hatten, wurden sie subkultiviert (0.25 % Trypsin); danach hätten sie eine Dichte von 3 x 10^4 Zellen/ cm^2. Diese Prozedur wurde 1-3 mal wiederholt. Die Kultivierung der Rattenherzfibroblasten wurde von Dr. Karl Werdan, Medizinische Klinik I des Klinikums Großhadern, München, durchgeführt. Zur Fraktionierung wurden die Zellen durch Füllung der Kulturflaschen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend gefriergetrocknet (siehe 2.6).

2.5 Isolierung von Leberzellen

Leberzellen wurden aus Lebern gefütterter männlicher Albinoratten nach der Methode von Berry & Friend (1969) modifi-

ziert nach Sies (Sies et al., 1977a) isoliert. Zur Inkubation wurden die Hepatozyten in einen 25 ml Erlenmeyerkolben übergeführt und bei 37°C 20 min inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt 10 mM Glukose, 2.1 mM Laktat, 0.3 mM Pyruvat, 0.6 mM DL-3-Hydroxybutyrat, 0.3 mM Azetoazetat und 2.4 mM Ornithin in Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer und war mit Carbogengas (O_2/CO_2, 95:5 v/v) äquilibriert. Die Konzentration an Hepatozyten war ungefähr 30 - 40 mg Protein/ml. Während der Inkubation wurde der Ansatz geschüttelt (Frequenz 120/min). Der Frierstopp erfolgte nach Wollenberger (Wollenberger et al., 1960) modifiziert nach Soboll (Soboll et al., 1980a).

2.6 Fraktionierung von Gewebe oder Zellen in nicht-wässrigen Medien (Elbers et al., 1974)

Das tiefgefrorene Material wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend in einem Gefriertrocknungsapparat 72 h bei -40°C und 0.002 torr getrocknet. Die anschließende Fraktionierung des trockenen Pulvers in n-Heptan-CCl_4-Lösungsmittelgemischen verschiedener Dichte ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Etwa 300 mg des trockenen Materials wurden in 11 ml eines Lösungsmittelgemisches der Dichte 1.23 g/ml suspendiert und mit einem Ultraschallgerät (Branson B12, 150W) 5 min lang beschallt, wobei abwechselnd 5 s beschallt und 5 s gekühlt wurde. Das Kühlbad bestand aus einer Mischung von

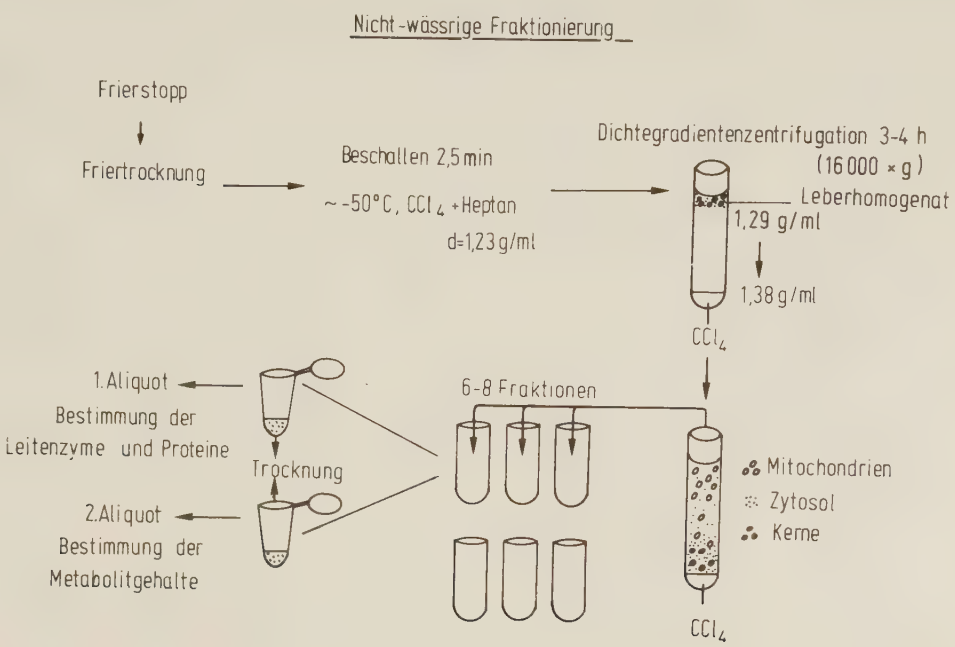

Nicht-wässrige Fraktionierung
Frierstopp
Friertrocknung
Beschallen 2,5 min
~ -50°C, CCl4 + Heptan
d=1,23 g/ml
Dichtegradientenzentrifugation 3-4 h
(16000 × g)
Leberhomogenat
1,29 g/ml
1,38 g/ml
CCl4
1. Aliquot
Bestimmung der
Leitenzyme und Proteine
Trocknung
2. Aliquot
Bestimmung der
Metabolitgehalte
6-8 Fraktionen
Mitochondrien
Zytosol
Kerne
CCl4

Abb. 3:

n-Heptan und Trockeneis. Das Homogenat wurde über einer Glasperlensäule (2 x 10 cm, Glasperlen 0.5 mm Ø) von groben Teilen gereinigt und wie in Abb.3 in einem logarithmischen Dichtegradienten aus n-Heptan-CCl_4-Lösungsmittelgemischen durch Gleichgewichtszentrifugation bei 16,500 x g aufgetrennt; aus dem Gradienten erhielt man 6 - 8 Fraktionen mit unterschiedlichem Gehalt an mitochondrialem und zytosolischem Protein. Alle Arbeitsgänge wurden bei 0-4°C ausgeführt. Die Dichten der Lösungsmittelgemische, aus denen der Gradient hergestellt wurde, waren für perfundierte Leber und Herz 5 ml Gemisch 1.38 g/ml + ca 6 ml Gemisch 1.29 g/ml; für isolierte Hepatozyten und kultivierte Rattenherzenfibroblasten 5 ml 1.43 g/ml + ca 6 ml 1.33 g/ml.

Bei Lebern, die der Ratte in situ entnommen wurden und die viel Blut enthalten, wurde das trockene Pulver in einem Lösungsmittelgemisch der Dichte 1.29 g/ml beschallt, das Homogenat in der Glasperlensäule gereinigt und 5 min bei 10,500 x g zentrifugiert. Der Überstand (enthält 70 % der Erythrozyten, siehe 3.1.4, Tabelle 5) wurde verworfen und das Sediment im Gradienten (5 ml 1.38 g/ml + ca. 6 ml 1.29 g/ml) wie perfundierte Lebern aufgetrennt.

Die Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden mit n-Heptan aufgefüllt, zentrifugiert und die Überstände abpipettiert. Das Sediment wurde nach Zugabe einer Spatelspitze Quarz aufgewirbelt, in einen Exsikkator eingebracht und in Vakuum ge-

trocknet. Die Aliquots für Enzymmessungen enthalten ca. 0.1 - 1 mg Protein, für Metabolitanalysen 1 - 5 mg Protein.

2.7 Herstellung der Extrakte und analytische Verfahren.

Extrakte für Enzymaktivitätsbestimmungen:

Zur getrockneten Probe wurden 0.5 ml 0.25 mM Phosphatpuffer pH 7.4 gegeben und die Probe in einem modifizierten Desintegrator (Zellhomogenisator MSK Braun Melsungen) 4 x in 30 s Intervallen jeweils geschüttelt und mit Eis gekühlt. Anschließend wurde dazu 0.5 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 pipettiert und vermischt.

Extrakte für Metabolitanalysen:

Zu dem trockenen Material wurde 1.0 ml kalte 0.6 M Perchlorsäure hinzugefügt und wie oben 45 s geschüttelt. Darauf standen die Extrakte 10 min im Eisbad und wurden anschließend zentrifugiert. 0.75 ml des Überstandes wurden abpipettiert und mit einem Gemisch bestehend aus 6 M KOH und 1 M Triäthanolamin neutralisiert und anschließend zentrifugiert.

Analytische Verfahren:

Es wurden

a) die Aktivitäten folgender Enzyme und

b) die Gehalte folgender Metabolite bestimmt.

a) Citratsynthase, Phosphoglyceratkinase, Glutamatdehydrogenase (Bücher, 1955; Kornberg, 1955),

b) ATP, ADP, AMP, Phosphat, Citrat, Malat, α-Ketoglutarat, Glutamat, Aspartat, Kreatin, Kreatinphosphat (Bergmeyer, 1974; Lowry & Passoneau, 1972).

In den Extrakten für a) wurde Protein (Lowry et al., 1951) bestimmt. Alle Analysen wurden in jeder Fraktion und im unfraktionierten Homogenat ausgeführt.

2.8.1 Berechnung der Metabolitgehalte in Mitochondrien und Zytosol (Elbers et al., 1974)

Die Fraktionierung in nicht-wässrigen Medien dient nicht der Isolation reiner Mitochondrien, man gewinnt vielmehr 6-8 Fraktionen mit unterschiedlicher Anreicherung mitochondrialer und zytosolischer Anteile (siehe Abb.3). Die Bilder 4-8 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen des lyophilisierten Gewebes, des Homogenates und dreier verschiedener Fraktionen des Dichtegradienten. Man kann erkennen, daß die Fraktionen unterschiedliche Mengen mitochondrialen und zytosolischen Materials enthalten. Durch Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme für Mitochondrien und Zytosol, z.B. Citratsynthase und Phosphoglyceratkinase, in jeder Fraktion kann man den Anteil an Mitochondrien und Zytosol in jeder Fraktion ermitteln. In Abb. 9 sind die Aktivitäten der Leitenzyme Citratsynthase bzw. Glutamatdehydrogenase für Mitochondrien, Phosphoglyceratkinase bzw. Laktatdehydrogenase für das Zytosol, Katalase für die Peroxisomen, NADPH-Cytochrom c Reduktase

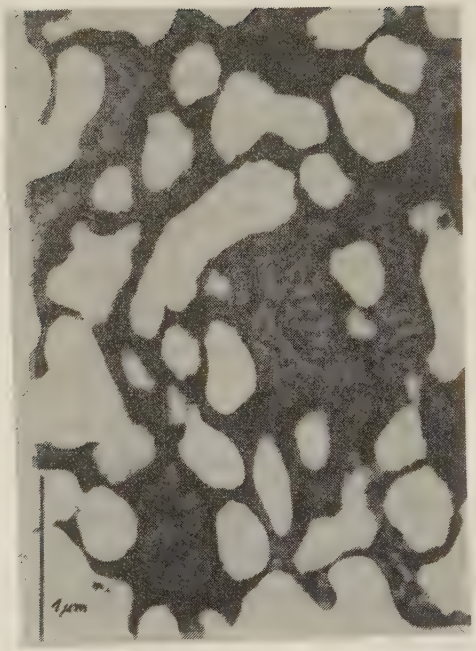
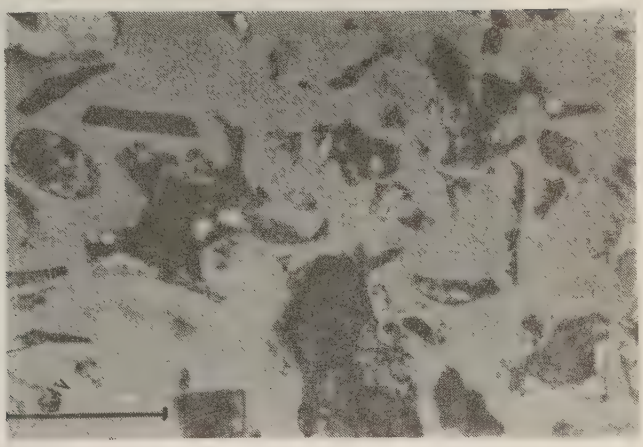


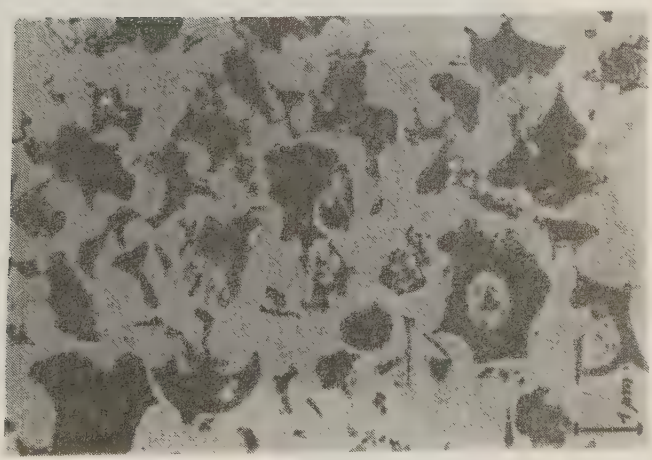
Abb. 4 - 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des lyophilisierten Leberpulvers (4), des Homogenates (5), einer mitochondrialen (6), zytosolischen (7) und einer Kernfraktion (8).

Abb. 5



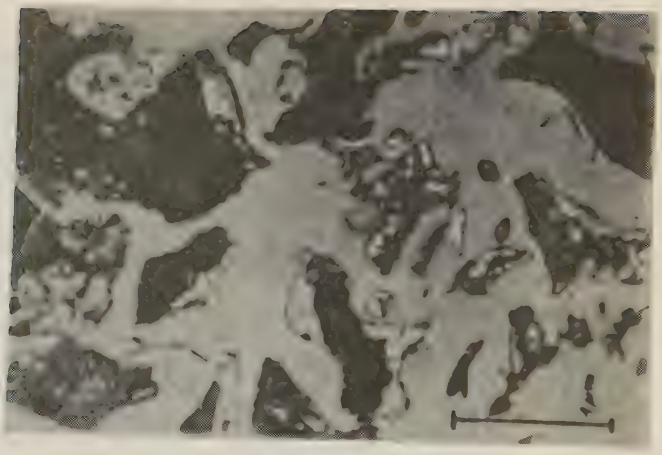
Homogenat

Abb. 6



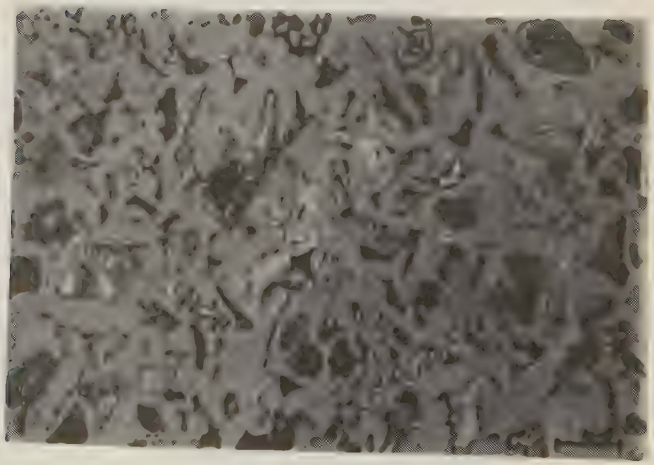
mitochondriale Fraktion

Abb. 7 :



Zytosolische Fraktion

Abb. 8 :



Kernfraktion

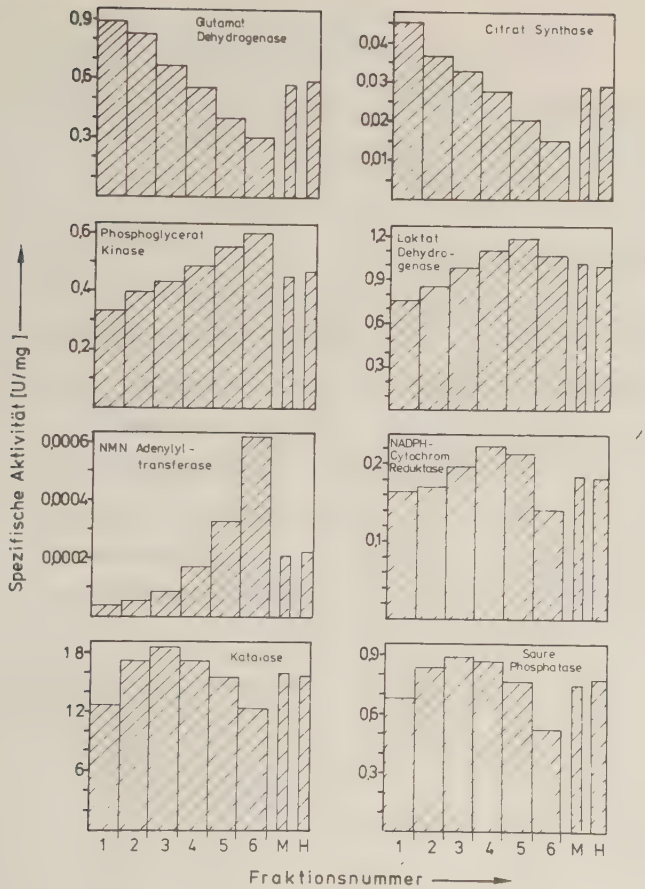


Abb. 9 : Verteilung der spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten und im unfraktionierten Homogenat (H). (M) ist der aus den Fraktionen berechnete Mittelwert. Glutamatdehydrogenase und Citratsynthase sind Leitenzyme für die Mitochondrien, Phosphoglyceratkinase und Laktatdehydrogenase für das Zytosol, NMN-Adenylyltransferase für den Kernraum, NADPH-Cytochrom c Reduktase für das endoplasmatische Retikulum, Katalse für die Peroxisomen und saure Phosphatase für die Lysosomen.

für das endoplasmatische Retikulum, saure Phosphatase für die Lysosomen und NMN-Adenylyltransferase für den Kernraum, für jede Fraktion graphisch dargestellt (modifiziert nach Ebers et al., 1974).

Wenn man annimmt, daß die Metabolite und löslichen Enzyme eines jeden Kompartimentes fest zusammenhängen und während der Fraktionierung nicht voneinander getrennt werden, daß ferner kein Metabolit oder Enzym durch die organischen Lösungsmittel extrahiert wurde, so kann man die Schlußfolgerung ziehen: Metabolite und Enzyme eines Kompartimentes befinden sich immer in einem konstanten Verhältnis zueinander, das heißt, der Quotient aus Substratgehalt und Enzymaktivität eines jeden Kompartimentes ist konstant.

II. $Metabolit_{mit.}/CS = a$ CS = Citratsynthaseaktivität

III. $Metabolit_{zyt.}/PGK = b$ PGK= Phosphoglyceratkinase-aktivität

Für die unter 2.6 erhaltenen Fraktionen gilt:

IV. $Metabolit_{total} = Metabolit_{mit} + Metabolit_{zyt}$

Durch Einsetzen der Gleichungen II und III in IV erhält man:

V. $Metabolit_{total} = a \times CS + b \times PGK \quad /: CS$

$Metabolit_{total}/CS = a + b \times PGK/CS$

Daraus ergibt sich die Gleichung einer Geraden mit den Variablen

$$y = \text{Metabolit}_{\text{tot.}} / \text{CS} \quad \text{und} \quad x = \text{PKG}/ \text{CS}$$

Mißt man die Aktivitäten beider Markerenzyme und die Metabolitgehalte in allen Fraktionen, so kann man die Gleichung für jede Fraktion und auch für das Homogenat erfüllen; die Auftragung im Koordinatensystem $\text{Metabolit}_{\text{tot.}}/\text{CS}$ gegen PGK/CS ergibt dann eine Gerade (Abb. 1o). Durch lineare Regression lassen sich die Werte a und b für jeden Metaboliten bestimmen, für den die Grundannahmen Untrennbarkeit vom jeweiligen Kompartiment und Unlöslichkeit in n-Heptan und CCl_4 zutreffen.

Stellt man sich eine Fraktion vor, die nur aus mitochondrialem Material besteht, so muß darin PGK gleich Null sein. Eingesetzt in V ergibt das:

VI. $\text{Metabolit}_{\text{tot.}} = \text{Metabolit}_{\text{mit.}} = a \times \text{CS}$

Dies gilt auch z.B. für den speziellen Fall des Proteingehaltes.

VII. $\text{Protein}_{\text{tot.}} = \text{Protein}_{\text{mit.}} = a_1 \times \text{CS}$

VI / VII :

$\text{Metabolit}_{\text{mit.}} / \text{Protein}_{\text{mit.}} = a/ a_1$

Auf diese Weise gelangt man zu dem mitochondrialen Gehalt eines Metaboliten, bezogen auf mitochondriales Protein.

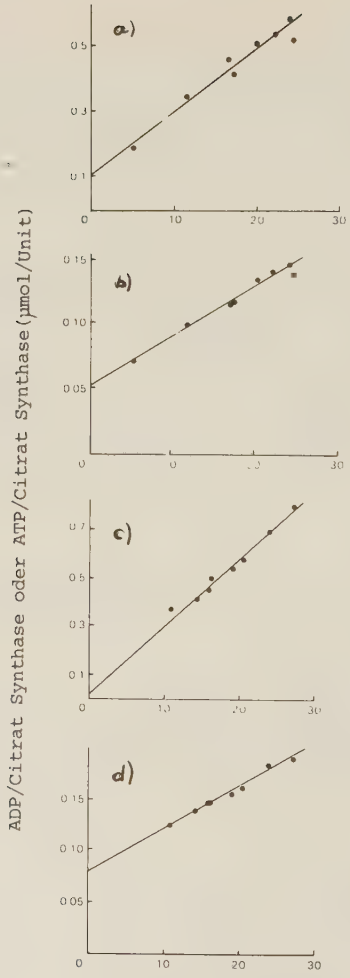


Abb. 1o : Auftragung von ATP(ADP) gegen Cictratsynthase - und Phosphoglyceratkinaseaktivität in den Fraktionen des Dichtegradienten nach Gleichung V für isolierte Hepatozyten a(b) und perfundierte Leber c(d) (aus Soboll et al.,198o).

Für das Zytosol gilt analog:

VIII $Metabolit_{tot.} = Metabolit_{zyt.} = b \times PGK$

IX $Protein_{tot.} = Protein_{zyt.} = b_1 \times PGK$

VIII / IX :

$Metabolit_{zyt.} / Protein_{zyt.} = b/b_1$

2.8.2 Bildung der Mittelwerte der Enzym- und Metabolitverteilung in mehreren Einzelgradienten (Elbers et al., 1974).

Die Meßwerte für die Berechnung der intrazellulären Metabolitverteilung sind wie alle Meßwerte mit einem statistischen Fehler behaftet. Dieser Fehler ließe sich verkleinern, wenn die Ergebnisse mehrerer Gradienten derselben Leber zu einem durchschnittlichen Gradienten zusammengefaßt werden könnten. Man kann

a) die aus jedem einzelnen Gradienten errechneten mitochondrialen und zytosolischen Werte mitteln oder

b) vor der Extrapolation einen mittleren Gradienten errechnen und diesen dann extrapolieren. Der Weg b) führt zu genaueren Ergebnissen, da nach Wegfallen der statistischen Fehler der Meßwerte die Extrapolation genauer durchgeführt werden kann. Es wäre nicht korrekt, die einzelnen Fraktionen mehrerer Gradienten zu mitteln und aus diesem Gradienten die Mittelwerte der subzellulären Metabolitgehalte durch Extrapolation

zu bestimmen, da die verschiedenen Fraktionen eines Gradienten einen unterschiedlichen Proteingehalt haben und da die relative Verteilung von mitochondrialem und zytosolischem Protein variiert. Es wurde daher ein Berechnungsverfahren für b) programmiert, das folgendermaßen vorgeht:

Normierung: Aus der Summe der Aktivitäten des jeweiligen Enzyms (oder aus der Summe der Metabolitgehalte aller Fraktionen eines Gradienten), bezogen auf die Summe des Proteins des gesamten Gradienten wird die mittlere spezifische Aktivität (der mittleren Metabolitgehalt/mg Protein) berechnet und die Werte aus den Fraktionen zu ihrem Mittelwert in Beziehung gesetzt. Dadurch erhält man normierte Werte, die das Vielfache oder den Bruchteil des Wertes der Fraktion vom Mittelwert angeben.

Mitteln: Die normierten Werte werden in 24 Registern eines Computers folgendermaßen gespeichert: Der gesamte Proteingehalt eines Gradienten ist 100 % und wird 24 Registern des Computers gleichgesetzt. Jede Fraktion enthält einen bestimmten Anteil des Proteins des Gradienten, der den entsprechenden Registern zugeordnet wird. Die normierte Aktivität eines Enzyms bzw. die normierten Metabolitgehalte werden jeweils in den einer Fraktion zugeordneten Registern addiert. Die Zuordnung der Fraktionen zu den Registern und die Aufsummierung der Werte in den Registern wird für die Enzymaktivität (den Metabolitgehalt) aller zu mittelnden

Gradienten ausgeführt. Danach wird, bei Register 1 beginnend, aus je drei Registern der Mittelwert gebildet. Der Computer hat damit einen neuen Gradienten errechnet, der aus 8 Fraktionen gleichen Proteingehaltes besteht und die Verteilung der Enzymaktivitäten (der Metabolitgehalte) in dem Gradienten, ausgedrückt in normierten Werten, enthält. Durch Multiplikation dieser Werte mit dem aus allen Gradienten errechneten Mittelwert für die spezifische Aktivität eines Enzyms (dem Metabolitgehalt/mg Protein) erhält man die Absolutwerte für 8 Fraktionen eines errechneten Gradienten. Das Verfahren wird für alle Metabolite und Leitenzyme wiederholt. Aus der errechneten Verteilung der spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme und der Metabolitgehalte/mg Protein in den Fraktionen kann durch Extrapolation der mittlere mitochondriale und zytosolische Metabolitgehalt nach 2.8.2 berechnet werden. Für die Berechnung wurde ein Tischcomputer der Fa. Wang (Wang 612) benutzt.

2.8.3. Berechnung der mitochondrialen und zytosolischen Konzentrationen der Metabolite aus den Gehalten in Mitochondrien und Zytosol.

Gehalt von Protein und Wasser in perfundierter Rattenleber:

a) Protein	(mg Protein/g frisch)	
total	135	(19% Trockengewicht der Leber/1.43*)
mitochondrial	52	(Scholz & Bücher, 1965)
zytosolisch	83	

* Der Faktor 1.43 stellt den Quotienten aus Trockengewicht und

Proteingehalt dar und ist der Mittelwert aus 21 Bestimmungen.

b) Wasser (µl Wasser/g frisch)

total	810	43 % extrazelluläres Wasser (Bücher et al.,1972)
zellulär	462	57 % Gewebswasser
mitochondrial	83	1.6 µl Wasser/mg mitochondriales Protein (Pfaff et al.,1968a)
zytosolisch	379	

c) (µl Wasser/ mg Protein)

Mitochondrien	(µl Wasser/mg Protein)	
total	1.6	nach Pfaff (Pfaff et al., 1968a) beträgt das nicht osmotische, d.h. das Hydratwasser, 50% des Gesamtwassers
nicht osmot.Wasser	0.8	
osmotisches Wasser	0.8	
Zytosol	(µl Wasser/mg Protein)	
total	4.6	
nicht osmot.Wasser	0.8	
osmotisches Wasser	3.8	

Für die Umrechnung nmol Metabolit/mg mitochondriales bzw. zytosolisches Protein wurde in Leber und in kultivierten Rattenherzfibroblasten der berechnete mitochondriale Wert von 0.8 µl Wasser/mg Protein und der zytosolische Wert von 3.8 µl/mg Protein verwendet. Für Herzgewebe von Ratten wurden von Kauppinen (Kauppinen et al., 1980) ein mitochondrialer Wert von 1.8 µl/mg Protein und ein zytosolischer Wert von 3.8 µl/mg Protein be-

stimmt. Diese Werte wurden auch in der vorliegenden Arbeit zur Berechnung von Metabolitkonzentrationen im isolierten Meerschweinchenherzen verwendet.

2.9 Fraktionierung der Hepatozyten mit Digitonin.

Die Fraktionierung der Leberzellen in Mitochondrien und Zytosol mit Hilfe der Digitonin-Methode (Zuurendonk & Tager, 1974) erfolgte nach einer Modifikation (Sies et al., 1977a): Nach 15 - 20 min wurden dem Inkubationsansatz (2.5) zwei Proben von je 1 ml entnommen. Probe 1 wurde direkt mit $HClO_4$, 0.94 M Endkonzentration, für die Bestimmung der Metabolitgehalte enteiweißt. Probe 2 wurde mit 5 ml eines Trennmediums (-2°C) vermischt, das folgende Zusammensetzung hatte: 0.25 M Saccharose, 20 mM 3-(N-morpholino) Propansulfonat, pH 7.0, 3 mM EDTA, 2.4 mM Digitonin. Nach 15 s wurde das Gemisch durch 2 ml eines Gemisches von Silikonölen verschiedener Dichte (Wacker Chemie AR 200 und General Electric SF 96/100 im Verhältnis 8 : 1, v/v) in 2 ml $HClO_4$, 0.94 M zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes der Probe 2 wurde zur Bestimmung der mitochondrialen und zytosolischen Leitenzyme, Glutamatdehydrogenase und Laktatdehydrogenase verwendet. Die Enzymaktivitäten im Inkubationsansatz wurden in einer Probe bestimmt, die mit 0.5 % Lubrol WX behandelt worden war, und diente als Referenz (=100%). Zur Bestimmung der Metabolite ATP und

ADP wurde 4 ml des Überstandes schnell mit $HClO_4$ enteiweißt. Die sauren Extrakte wurden mit KOH-6M-Triäthanolamin-1M auf einen pH-Wert von etwa 6 - 7 gebracht.

Die Extrakte des Sedimentes der Probe 2 wurden als mitochondrial, die Extrakte der Überstände als zytosolisch bezeichnet. Probe 1 wurde als Gesamtextrakt bezeichnet.

2.10 Isolation von Mitochondrien aus Rattenleber (Klingenberg & Slenczka, 1959)

Die Leber wurde in eiskaltem Isolationsmedium (Saccharose 0.25 M, Triäthanolaminhydrochlorid 0.01 M, Kaliumdihydrogenphosphat 2.5 mM, pH 7.4) zerkleinert und gespült. Anschließend wurde das Gemisch in einem 60 ml Glas-Teflon-Potter homogenisiert und das Homogenat bei 400 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 7700 x g 10 min zentrifugiert und das Sediment in 40 ml Isolationsmedium resuspendiert. Dabei wird das Sediment um den zentralen Erythrozytenfleck herum abgeschabt. Die Suspension wurde abermals bei 7700 x g 10 min zentrifugiert und das Sediment in einen 5 ml Glas-Teflon Homogenisator übergeführt, auf 5 ml mit Isolationsmedium aufgefüllt und vorsichtig homogenisiert. Alle Arbeiten wurden bei $0^{\circ}C$ ausgeführt. Die Mitochondriensuspension wurde in Eis aufbewahrt.

3. Resultate

3.1 Zuverlässigkeit der Methode

3.1.1 Extrahierbarkeit der Substrate

Das unter 2.6 beschriebene Extrapolationsverfahren basiert unter anderem auf der Annahme, daß die zu untersuchenden Metabolite während der Fraktionierung in n-Heptan-CCl_4-Lösungsmittelgemischen nicht herausgelöst werden und damit nicht umverteilt werden. Dies muß für jeden Metaboliten untersucht werden. Unsere Untersuchungen ergaben, daß nach Ultraschallaufschluß des Leberpulvers weniger als 0.5 % des gesamten Gehaltes von ATP, ADP, AMP, Citrat, Malat, α-Ketoglutarat, Glutamat, Aspartat und DMO im Überstand in den wasserfreien Lösungsmitteln gefunden wurde (Tabelle 2). Diese Werte sind wahrscheinlich zu hoch, da geringe Mengen des beschallten Gewebematerials bei der Zentrifugation im Überstand verbleiben können. Daher kann man den "Extraktionseffekt" als vernachlässigbar bezeichnen.

3.1.2 Aktivitätsverlust der Enzyme.

Die Genauigkeit der Extrapolation beruht zu einem wesentlichen Teil auf der Bestimmung der Aktivität der Leitenzyme. Obwohl die Aktivitäten der meisten Enzyme nach der Fraktionierung im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte liegen, stellte sich heraus, daß die Akti-

Tabelle 2: Extrahierbarkeit von Metaboliten in Heptan-CCl_4-Gemischen.

Etwa 200 mg lyophilisiertes Leberpulver wurde in 11 ml Heptan-CCl_4-Gemisch der Dichte 1.23 g/ml beschallt wie im Methodenteil beschrieben und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde im Lyophilisator eingedampft und das Sediment ebenfalls getrocknet. Beides wurde mit 0.6 M $HClO_4$ extrahiert, neutralisiert und in den Extrakten die Metabolitgehalte gemessen.

Metabolit	Gehalt nmol/ mg Protein	herausgelöst Menge nmol/ mg Protein	% extrahiert
Aspartat	4.3	0.02	< 0.5
Glutamat	14.2	0.02	< 0.1
Citrat	4.2	0.02	< 0.5
Malat	5.6	0.03	< 0.5
ATP	14.0	0.01	< 0.1
ADP	3.1	0.003	< 0.1
AMP	1.2	0.001	< 0.1
DMO +	----	----	< 0.5

+ Es wurde die Radioaktivität im Sediment und im Überstand des beschallten Pulvers einer Leber bestimmt, die mit ^{14}C- DMO perfundiert worden war.

vitäten der Leitenzyme Citratsynthase und Phosphoglyceratkinase während der Fraktionierung absinken. Der Abfall beträgt zwischen 10 und 30 % (Tabelle 3)

Tabelle 3: Aktivitätsverlust der Markerenzyme bei der Behandlung mit Heptan-CCl_4 Lösungsmittelgemischen.

8 - 10 mg lyophilisiertes Leberpulver von 5 verschiedenen Lebern wurde a) mit 1 ml Lösungsmittelgemisch der Dichte 1.23 g/ ml unter Kühlen wie im Methodenteil beschrieben, beschallt, danach abzentrifugiert und das Sediment getrocknet. Das trockene Sediment wurde in Phosphatpuffer aufgelöst und in der Lösung die Aktivitäten von Citratsynthase und Phosphoglyceratkinase bestimmt. b)Das Pulver wurde mit 1 ml Phosphatpuffer versetzt, unter Eiskühlung kurz beschallt und in der Lösung die Aktivitäten der Markerenzyme bestimmt.

Expt.	Phosphoglyceratkinase			Citratsynthase		
	a	b	a x 100/b	a	b	a x 100/b
	mU/mg Protein		%	mU/mg Protein		%
1	540	640	84	13.0	17.2	76
2	510	710	72	17.8	21.0	85
3	550	650	85	17.0	23.3	73
4	420	600	70	13.8	17.3	80
5	460	650	71	18.4	16.8	109
			76 $\pm$3			85 $\pm$6

Da bei der Extrapolation jedoch nur die relativen Enzymaktivitäten in jeder Fraktion von Bedeutung sind, d.h. die prozentuale Abnahme oder Zunahme der Aktivität eines jeden Leitenzyms,und da die Abnahme in jeder Fraktion gleichermaßen erfolgt,wird dies für das Extrapolationsverfahren vernachlässigt.

3.1.3 Genauigkeit der Extrapolation.

Die Berechnung mitochondrialer und zytosolischer Metabolitgehalte beruht auf der Bestimmung der Steigung einer Geraden und ihres Schnittpunktes auf der Ordinate durch lineare Regression. Die Genauigkeit der Werte verringert sich umsomehr, je näher am Nullpunkt des Koordinatensystems die Gerade schneidet, das heißt, wenn die Mitochondrien oder das Zytosol nur einen ganz kleinen Teil des gesamten Metabolitgehaltes enthalten, ist die Bestimmung der subzellulären Verteilung des Metaboliten relativ ungenau im Vergleich zu der Bestimmung der Verteilung eines Metaboliten, dessen Konzentrationsgradient zwischen beiden Kompartimenten kleiner ist. Die Genauigkeit wurde zum einen dadurch erhöht, daß eine optimale Anzahl von Fraktionen aus den Gradienten,und damit Meßpunkte für die Gerade,gewonnen wurde. Bei der erreichten Auftrennung erwiesen sich 8 Fraktionen als optimal. Zum anderen wurden von jeder Leber mindestens 4 - 6 Gradienten gemacht und die Ergebnisse gemittelt(siehe 2.8.2). Ein Meßwert entspricht da-

mit praktisch 4 - 6 Einzelmessungen, die aber statistisch nur als n = 1 erscheinen. Dadurch konnte die Genauigkeit der Extrapolation so verbessert werden, daß zuverlässige Ergebnisse erhalten wurden. In Abb. 10 sind Regressionsgeraden für ATP und ADP für ein Experiment mit perfundierter Leber und ein Experiment mit isolierten Hepatozyten aufgetragen, die durch mitteln der Einzelgradienten erhalten wurden. Aus diesen Geraden ist eine sichere Bestimmung der Koeffizienten a und b der Geradengleichung möglich.

3.1.4 Verunreinigung durch andere Kompartimente.

Bei der Extrapolation geht man von der Annahme aus, daß die Zelle im wesentlichen aus nur zwei Räumen besteht, dem mitochondrialen und dem zytosolischen Kompartiment. Wenn Metabolite bestimmt werden sollen, die außer im mitochondrialen und zytosolischen Kompartiment auch noch in anderen Räumen vorkommen, so muß dieser Raum entweder vernachlässigbar klein sein und die Konzentration des Metaboliten in diesem Raum nicht höher als in dem angrenzenden Kompartiment, oder es muß der Gehalt des Metaboliten, der dem dritten Raum zukommt, in jeder Fraktion vor der Extrapolation sub trahiert werden.

a) der Extrazellulärraum: Zur Bestimmung der subzellulären Verteilung des Phosphats und des DMO wurde der Extra-

zellulärraum aus der spezifischen Radioaktivität von ^{3}H-Inulin in jeder Fraktion bestimmt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anteil des extrazellulären Raumes in µl/ mg Protein in jeder Fraktion des Dichtegradienten.

Homogenat	1.5 - 2 µl/ mg Protein
Fraktion 1	1 µl/ mg Protein
Fraktion 2	1 µl/ mg Protein
Fraktion 3	1 µl/ mg Protein
Fraktion 4	1 µl/ mg Protein
Fraktion 5	1.5 µl/ mg Protein
Fraktion 6	1.5 µl/ mg Protein
Fraktion 7	2 - 3 µl/ mg Protein
Fraktion 8	2 - 4 µl/ mg Protein

Nach Messung der Phosphatkonzentration bzw. der DMO-Konzentration im Perfusat wurde der entsprechende Phosphatgehalt(bzw. DMO-Gehalt) in jeder Fraktion abgezogen; danach konnte das Extrapolationsverfahren angewendet werden.

b) Lysosomen und Peroxisomen: Diese machen zusammen weniger als 5 % des gesamten Raumes der Zelle aus und können im allgemeinen vernachlässigt werden. Allein bei der Bestimmung des mitochondrialen und zytosolischen pH-Wertes könnten die Lysosomen aufgrund ihres sauren Milieus einen beträchtlichen Anteil einer Indikatorbase akkumulieren und so das Extrapolationsverfahren stören. Deshalb wurde zur subzellulären pH-Bestimmung die schwache Säure DMO gewählt, die von den Lysosomen praktisch ausgeschlossen wird.

c) Zellkern: Der Zellkern wurde dem Zytosol zugerechnet, da das zytosolische Markerenzym Phosphoglyceratkinase sowie die untersuchten Metabolite die gleiche Verteilung in Zytosol und Kernraum haben (Siebert & Humphrey, 1965).

d) Erythrozyten: Diese spielen bei der hämoglobinfrei perfundierten Leber, dem perfundierten Herzen oder den isolierten Zellen keine Rolle. Lebern, die der Ratte in situ entnommen wurden, enthalten jedoch einen erheblichen Anteil Blut (ca 7 %, Hohorst et al., 1959). Bei der Fraktionierung erscheinen die Erythrozyten in den obersten Fraktionen des Dichtegradienten, d.h. in den mit Mitochondrien angereicherten Fraktionen. Da sie in vieler Hinsicht, z.B. bezüglich der Aktivität der Marker-

enzyme oder der Verteilung von ATP und ADP dem Zytosol ähnlich sind, stören sie die Bestimmung mitochondrialer und zytosolischer Metabolitgehalte erheblich. Es wurde deshalb versucht, die Erythrozyten vor der Fraktionierung des Homogenates abzutrennen. Bei der Zentrifugation des über Glasperlen gereinigten Homogenates im Heptan-CCl_4-Gemisch der Dichte 1.29 g/ml (sonst 1.23 g/ml) verbleiben etwa 70 - 80 % der Erythrozyten im Überstand (Tabelle 5).

Tabelle 5: Hämoglobingehalt in perfundierter Leber und Leber"in situ".

Der Hämoglobingehalt wurde nach van Kampen & Zijlstra (1961)bestimmt.

	nmol Hb / g Trockengewicht
Hämoglobinfrei perfundierte Leber	70
Leber in situ	332
Sediment nach Abtrennung der Erythrozyten (siehe 2.4)	82
Überstand	550
1. Erythrozytenreiche Fraktion	134

Ein großer Teil des Restes erscheint in der ersten Fraktion des Dichtegradienten, die deshalb verworfen wird. Diese Fraktion enthält weniger als 1 % des gesamten Proteins, so daß ein Wegfallen dieser Fraktion nicht zu einer Verfälschung der Extrapolation führt. Die restlichen Fraktionen enthalten weniger als 40 pmol Hb/mg Protein, das entspricht dem Hb-Gehalt einer hämoglobinfrei perfundierten Leber (Tabelle 5).

3.2 Hämoglobinfreie Leberperfusion, Beschreibung des Stoffwechselzustandes.

Soweit die Lebern mit besonderen Substraten perfundiert wurden, wurden diese etwa 40 min nach Beendigung der Operation zugegeben, damit die Leber Zeit hatte, nach der vorübergehenden Anoxie während der Präparation ins metabolische Gleichgewicht zu kommen. Sodann wurde solange perfundiert, bis sich wieder ein neues metabolisches Gleichgewicht eingestellt hatte (ca 25 min Tabelle 6 / Abb. 11). Bei Zugabe von Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette (FCat, FDNP, FAm) wurde die Infusionszeit verkürzt, da infolge der erhöhten Glykolyserate der Glykogengehalt schneller erschöpft ist. Der Frierstopp erfolgte in diesen Experimenten zu Beginn der Einstellung eines neuen "Gleichgewichtszustandes" (siehe Abb. 12); der Zeitpunkt wurde anhand des Verlaufs der Sauerstoffkurve ermittelt. In Abb. 11 und 12 ist der

Tabelle 6: Experimentelle Bedingungen und Stoffwechselzustände.

Expt.	Ernährungs-zustand	Zusätze	Infusionsdauer	Stoffwechselzustand der Leber zum Zeitpunkt des Frierstopps
F	gefüttert	keine		Glykogenolyse, Glykolyse aus Glykogen
FS	gefüttert	Glukose 5mM, Laktat 2mM, Pyruvat 0.2mM	0 - 60 min.	"Ruhezustand", verringerte Glykolyse und Glykogenolyse
FE	gefüttert	Äthanol 2mM	36- 60 min.	Oxidation von Reduktionsäquivalenten aus Äthanol in der Atmungskette, reduziertes NAD System, verringerte Glykolyse
FN	gefüttert	NH_4Cl 2mM	36- 60 min.	Hohe Harnstoffsyntheserate, gesteigerte Atmungsrate, gesteigerte Glykolyse
FOl	gefüttert	Oleat 0.3 mM	36- 60 min.	Oxidation von Fettsäuren, gesteigerte Atmungsrate, Hemmung der Glykolyse
FCat	gefüttert	Carboxyatractylosid 0.06 mM	36- 60 min.	Hemmung des Adeninnukleotidtransportes gehemmte Atmung, gesteigerte Glykolyse
FDNP	gefüttert	Dinitrophenol 0.03 mM	54- 60 min.	Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, gesteigerte Atmung, gesteigerte Glykolyse
FAm	gefüttert	Amytal 0.6 mM	48- 60 min.	Hemmung der Atmungskette, hohe Glykolyserate
H	gehungert	keine		Oxidation endogener Fettsäuren, Ketogenese
HL	gehungert	Laktat, 2mM	36- 60 min.	Glukoneogenese aus Laktat, erhöhte Atmungsrate, verringerte Ketogenese
HD	gehungert	Dihydroxyaceton 2 mM	36- 60 min.	Glukose-und Laktatproduktion aus Triose erhöhte Atmung, verringerte Ketogenese
HG	gehungert	Glukose 25mM, Insulin, 5U/l	30 -60 min.	Glykolyse aus exogener Glukose

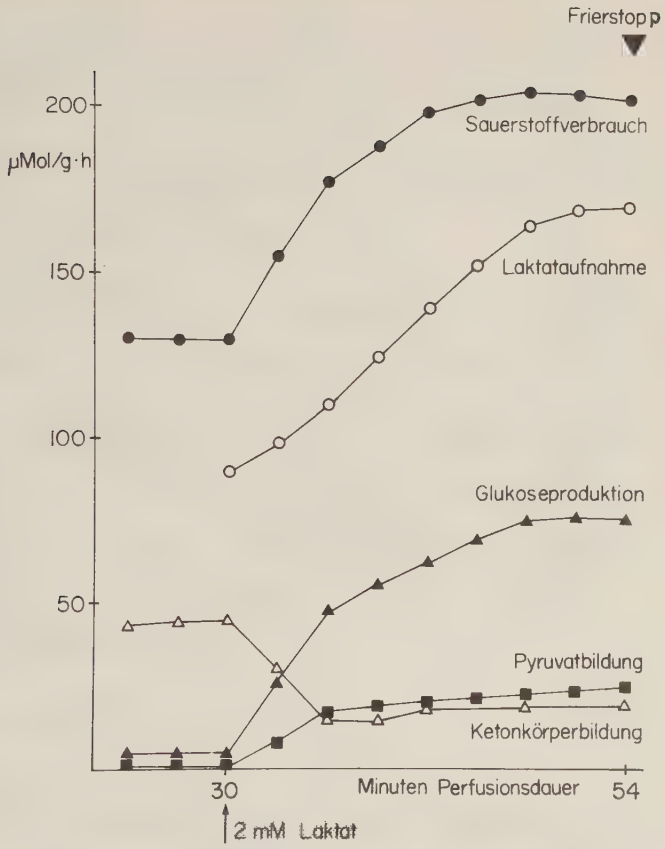


Abb. 11 : Experimentelles Protokoll der hämoglobinfreien Perfusion der Leber einer gehungerten Ratte, die mit 2 mM Laktat perfundiert wurde (HL, siehe Tabelle 6), erstellt aus Metabolitbestimmungen und der Bestimmung der Sauerstoffkonzentration im ausfließenden Perfusat.

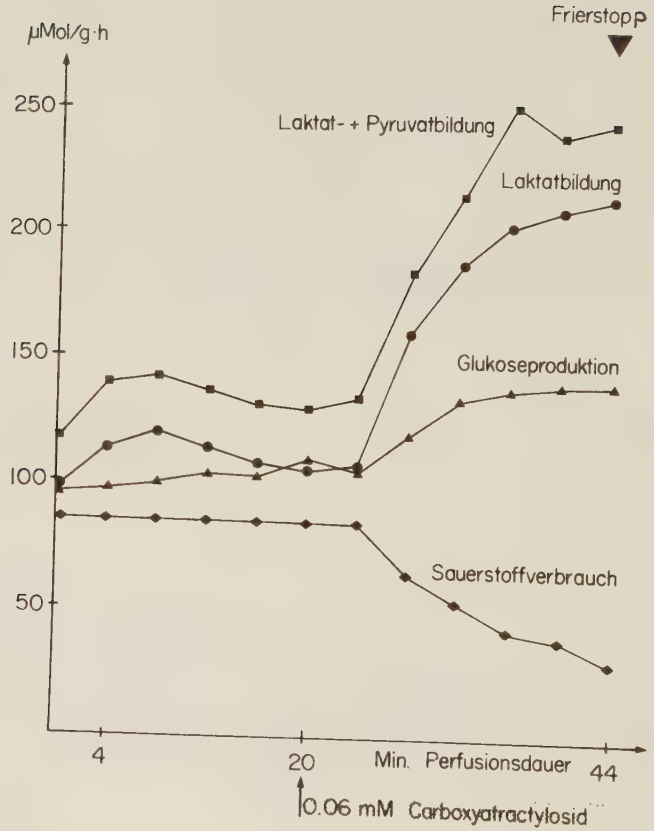


Abb. 12: Experimentelles Protokoll für (FCat, siehe Tabelle 6).

zeitliche Verlauf zweier Perfusionsexperimente anhand der Änderungen im Sauerstoffverbrauch, der Laktat- und Pyruvatbildung, der Glukosebildung und der mitochondrialen und zytosolischen Redoxquotienten dargestellt. Die Werte für diese Parameter zum Zeitpunkt des Frierstopps sind für alle Experimente in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Was den Ernährungszustand der Tiere betrifft, können die Experimente in zwei Gruppen unterteilt werden: Lebern gefütterter Ratten (F) und Lebern gehungerter Ratten (H).Da die Regulation subzellulärer Phosphorylierungspotentiale untersucht werden sollte, wurden Bedingungen gewählt, in denen entweder die zytosolische ATP-Synthese in der Glykolyse beeinflußt war, oder die mitochondriale ATP-Synthese in der Atmungskette (Tabelle 7).

Lebern gefütterter Ratten, die ohne Zusatz metabolisierbarer Substrate perfundiert werden (F), geben Glukose, Laktat und Pyruvat als Folge einer erhöhten Geschwindigkeit der Glykolyse und Glykogenolyse ins Perfusat ab. Infundiert man diese Substrate, so werden beide Prozesse verlangsamt (FS). Die Glykolyseaktivität ist bei Infusion von Äthanol (FE) als Folge einer Reduktion des zytosolischen NAD-Systems verringert. Sie ist auch bei Infusion von Oleat (FOl) leicht vermindert; auch hier beobachtet

Tabelle 7: Stoffwechselflußraten und Redoxquotienten. (Mittelwerte aus 5-28 Experimenten ± SEM; * n = 2)

Expt.	n	Sauerstoff-verbrauch	Glukose Produktion	Laktat + Pyruvat Prod.	Ketogenese	Harnstoff-Synthese	Laktat Pyruvat	Hydroxybut. Azetoazetat
		umol x g^{-1} x h^{-1}						
F	28	139 ± 5	74 ±4	103 ±6	5 ± 6	-----	3 ±0.3	0.3 ±0.04
FS	8	161 ± 7	----	42 ±16	------	------	10 ±1	1.0 ±0.1
FE	7	162 ± 9	107 ±5	38 ±3	9 ±1	------	31 ±5	0.6 ±0.09
FN	5	171 ±11	103 ±16	153 ±8	7 ±1	102 ±11	14 ±2	0.6 ±0.07
FOl	5	194 ±11	76 ±14	71 ±17	19 ± 0.2	-------	21 ±4	0.8 ±0.13
FCat.	5	81 ± 7	151 ±22	207 ±12	-------	------	9 ±0.6	3.0*
FDNP	7	255 ±14	156 ±19	264 ±12	------	------	8 ±1	0.7*
FAm	5	94 ± 8	122 ±13	260 ±27	------	------	9 ±0.7	2.3*
H	13	138 ± 8	7 ± 1	5 ±1	37 ±2	------	58*	0.2 ±0.02
HL	4	185 ± 9	80 ± 9	----	14 ±1	------	28 ±8	0.7 ±0.22
HD	4	181 ± 5	86 ± 6	64 ±11	15 ±4	------	6 ±0.1	0.3 ±0.09
HG	6	167 ± 5	------	66 ± 9	31 ±11	------	3 ±0.2	0.3 ±0.09

man einen Anstieg des Laktat/Pyruvat-Quotienten, der auf eine Reduktion des zytosolischen NAD-Systems schließen läßt. Offensichtlich handelt es sich dabei um eine Endproduktheмmung der Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase durch NADH (Velick & Furfine 1963).

Bei Zugabe von Inhibitoren der mitochondrialen ATP-Synthese wie Amytal (Hemmstoff der Atmungskette), Dinitrophenol (Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung) oder Carboxyatractylosid (Hemmstoff des Adeninnukleotidtransportes) ist die Geschwindigkeit der Glykolyse stark erhöht; dadurch wird die Hemmung der Versorgung des Zytosols mit mitochondrialem ATP teilweise kompensiert. Dies sei an einer Überschlagsrechnung demonstriert: In substratfrei perfundierten Lebern gefütterter Ratten beträgt die Geschwindigkeit der Glykolyse 100 µMol/g x h (Tabelle 7, Laktat + Pyruvatbildung), entsprechend 150 µMol ATP/g x h; das ist etwa 1/4 der ATP-Menge, die bei der oxidativen Phosphorylierung unter diesen Bedingungen gebildet wird. Bei leichter Hemmung der Atmungskette durch Amytal (F Am) erhöht sich die Aktivität der Glykolyse um weitere 160 µMol/g x h entsprechend einer ATP-Menge von 240 µMol/g x h. Dies ist einer mitochondrialen ATP-Synthesegeschwindigkeit von 40 µMol/g x h äquivalent (P/O-Quotient von 3 angenommen). Die Leber hat demnach genügend Glykolysekapazität, um 2/3 der mitochondrialen ATP-Synthese zu übernehmen.

Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn man diese Rechnung für (FCat) und (FDNP) aufstellt. Es ist jedoch Voraussetzung, daß die Leber genügend Glykogen enthält, um das nötige Substrat für die Glykolyse liefern zu können.

Auf der anderen Seite ist eine Steigerung der mitochondrialen ATP-Synthese zu beobachten, wenn die Glykolyse bei Infusion von Äthanol oder Oleat gehemmt ist. Eine stöchiometrische Beziehung zwischen Hemmung der Glykolyse und Steigerung des Sauerstoffverbrauches bei Äthanolzugabe ist von Thurman & Scholz (1977) gezeigt worden.

Bei Oleatinfusion ist eine überschießende Steigerung des Sauerstoffverbrauches zu beobachten, die nicht stöchiometrisch mit der Hemmung der Glykolyse in Beziehung zu setzen ist. Deren mögliche Ursachen werden später diskutiert (4.4).

Eine Steigerung der Geschwindigkeit der mitochondrialen und zytosolischen ATP-Synthese ist bei Infusion von NH_4Cl zu beobachten; diese dürfte auf den gesteigerten mitochondrialen und zytosolischen ATP-Verbrauch bei der Harnstoffsynthese zurückzuführen sein (Tabelle 7).

Lebern gehungerter Ratten enthalten praktisch kein Glykogen mehr. Bei Perfusion ohne Zusatz von metabolisier-

baren Substraten werden nur endogene Fettsäuren oxidiert; daher ist eine gesteigerte Ketogenese zu beobachten. Bei Zusatz glukoplastischer Substrate wie Laktat oder Dihydroxyaceton setzt eine intensive Glukoseproduktion ein; der erhöhte ATP-Bedarf wird durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch angezeigt. Insgesamt sind in Lebern gehungerter Ratten geringere ATP-Gehalte und daher niedrigere ATP/ADP-Quotienten zu erwarten, da die zytosolische ATP-Synthese in der Glykolyse entfällt.

3.3 Verteilung der Adeninnukleotide und des Phosphats.

In Tabelle 8 sind die Gehalte an ATP, ADP und AMP in perfundierten Lebern gezeigt. Im Hungerzustand ist die Summe der Adeninnukleotide gegenüber dem Futterzustand erniedrigt. Die ATP/ADP-Quotienten sind dort am höchsten, wo sowohl eine hone Glykolyse- als auch eine hohe mitochondriale ATP-Syntheserate gemessen wurde (F). Bemerkenswert ist, daß auch bei den Experimenten mit mitochondrialen Inhibitoren die ATP/ADP-Quotienten hoch sind. (FAm, FDNP,FCat). Die ATP/ADP-Quotienten sind im Hungerzustand am niedrigsten (H, HL, HD). Bei Zugabe von Glukose (HG) jedoch ist der ATP/ADP-Quotient erhöht. Hier erfolgte zusätzliche ATP-Synthese in der Glykolyse (Tabelle 7).

Tabelle 8: Adeninnukleotidgehalte in Lebergewebe

Mittelwerte von 3 - 7 Experimenten ± SEM

Bedingung		n	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP
			µmol/g Trockengewicht			
F	gefüttert; -	7	11.7±0.7	2.9±0.1	1.0±0.1	4.0±0.1
FS	gefüttert; Glukose etc.	6	9.6±1.0	3.5±0.2	1.4±0.2	2.7±0.4
FE	gefüttert; Äthanol	5	7.8±0.6	3.4±0.2	1.5±0.2	2.3±0.2
FN	gefüttert; NH_4Cl	5	10.1±0.2	4.3±0.2	0.8±0.07	2.4±0.1
FOL	gefüttert; Oleat	5	9.5±0.7	3.3±0.2	———	2.9±0.2
FAm	gefüttert; Amytal	4	9.8±1.0	3.4±0.3	1.2±0.1	2.9±0.2
FDNP	gefüttert; DNP	4	8.6±1.0	3.9±0.2	1.7±0.2	2.2±0.3
FCat	gefüttert; Carboxyatraktylosid	4	9.8±0.7	3.0±0.2	2.1±0.3	3.3±0.4
H	gehungert; -	5	6.9±0.3	4.0±0.3	1.5±0.1	1.7±0.1
HL	gehungert; Laktat	4	6.2±0.6	4.0±0.2	1.9±0.4	1.5±0.6
HD	gehungert; Dihydroxyaceton	3	6.6	4.1	1.5	1.6
HG	gehungert; Glukose	3	8.5	3.1	1.0	2.7

Die am Gewebs-ATP/ADP-Quotienten beobachteten Effekte sind an den zytosolischen ATP/ADP-Quotienten deutlicher zu erkennen (Tabelle 9). Man kann also davon ausgehen, daß der Gewebs-ATP/ADP-Quotient im wesentlichen den zytosolischen ATP/ADP-Quotienten widerspiegelt.

Die mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten sind stets erheblich niedriger (bis zu 50-fach, F) als die zytosolischen Quotienten; es besteht keine Korrelation zwischen der Aktivität der Atmungskette und den mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten in perfundierter Leber. Dagegen verhalten sich die mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten stets umgekehrt wie die zytosolischen, d.h. ein Anstieg des zytosolischen Quotienten ist von einem Abfall des mitochondrialen Quotienten begleitet und umgekehrt. Die Konzentrationen an ATP sind im Futterzustand in den Mitochondrien niedriger als im Zytosol, während sie bei Zugabe von DNP oder Carboxytraktylosid und im Hungerzustand in den Mitochondrien höher sind. Die Konzentration des ADP und AMP sind unter allen Bedingungen in den Mitochondrien höher als im Zytosol, in (F) und (FS) erheblich höher.

Es wurden auch die subzellulären Phosphatkonzentrationen bestimmt (Tabelle 10). Die mitochondrialen ebenso wie die zytosolischen Phosphatkonzentrationen liegen unter allen

Tabelle 9: Subzelluläre Adeninnukleotidkonzentrationen in perfundierten Lebern von gefütterten und gehungerten Ratten. Mittelwerte aus 3-7 Experimenten ± SEM

			Mitochondrial (mM)				Zytosolisch (mM)			
Bedingung		n	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP
F	gefüttert; -	7	1.4 ±0.3	7.8 ±0.6	3.8 ±0.3	0.18 ±0.03	7.2 ±0.5	0.7 ±0.1	0.06 ±0.01	10.3 ± 1.5
FS	gefüttert; Glukose etc.	6	1.9 ±0.3	7.8 ±0.5	3.1 ±0.6	0.24 ±0.05	5.8 ±0.5	1.1 ±0.1	0.4 ±0.1	5.3 ± 0.8
FE	gefüttert; Äthanol	3	2.1	7.2	4.2	0.29	4.9	0.9	0.2	5.5
FN	gefüttert; NH_4Cl	5	3.8 ±1.2	11.3 ±0.8	2.6 ±0.3	0.33 ±0.09	6.2 ±0.5	1.0 ±0.1	0.09 ±0.01	5.2 ±1.9
FOl	gefüttert; Oleat	5	4.4 ±0.6	7.4 ±1.0	—	0.59 ±0.02	4.9 ±0.4	1.1 ±0.09	—	4.8 ±0.9
FCat	gefüttert; Carboxyatr.	4	7.8 ±1.0	5.5 ±0.3	3.8 ±1.0	1.42 ±0.11	4.8 ±0.4	1.0 ±0.2	0.8 ±0.2	4.8 ±1.1
FAm	gefüttert; Amytal	4	4.3 ±1.1	9.0 ±0.2	3.5 ±0.3	0.48 ±0.12	5.1 ±0.5	0.9 ±0.1	0.3 ±0.06	5.7 ±0.7
FDNP	gefüttert; DNP	4	7.5 ±1.7	9.2 ±0.8	4.5 ±1.0	0.82 ±0.15	3.9 ±0.7	1.3 ±0.2	0.6 ±0.03	3.0 ±0.8
H	gehungert; -	5	5.2 ±0.6	7.8 ±0.8	1.5 ±0.2	0.67 ±0.06	3.7 ±0.2	1.4 ±0.1	0.7 ±0.1	2.6 ±0.1
HL	gehungert; Laktat	4	4.8 ±2.0	6.6 ±1.0	1.4 ±0.3	0.73 ±0.14	3.8 ±0.4	1.7 ±0.2	1.2 ±0.3	2.2 ±0.1
HD	gehungert; Dihydroxyac.	3	5.1	7.8	1.6	0.65	3.3	1.3	0.5	2.5
HG	gehungert; Glukose	3	4.9	7.8	1.6	0.63	4.5	0.9	0.35	5.0

Tabelle 10: Subzelluläre Phosphatkonzentrationen in perfundierter Rattenleber. Werte aus 11 Einzelexperimenten. Code für die Stoffwechselbedingungen siehe Tabelle 6.

Expt. Nr.	Phosphatkonzentrationen [mM]		Mitochondrien / Zytosol
	Mitochondrien	Zytosol	
F 3	7.4	7.1	1.0
F 6	10.4	9.3	1.1
FS 4	7.0	8.5	0.8
FS 5	7.7	6.1	1.3
FS 6	7.2	5.0	1.4
FE 1	9.6	10.8	0.9
FE 2	10.9	17.8	0.6
FCat. 4	8.0	10.4	0.8
H 5	8.6	10.0	0.9
HL 3	11.3	10.5	1.1
HD 1	7.6	8.9	0.9
Durchschnitt	8.7	9.5	0.98

untersuchten Stoffwechselbedingungen bei etwa 9 mM. Es konnte kein signifikanter Konzentrationsgradient des Phosphats zwischen Mitochondrien und Zytosol festgestellt werden. Zum Extrazellulärraum hält die Zelle dagegen einen Konzentrationsgradienten von etwa 8 aufrecht (Krebs-Henseleit Puffer enthält 1.2 mM Phosphat).

3.4 Konzentrationsgradienten (mitochondrial/zytosolisch) von Di- und Tricarbonsäuren und Δ pH über die Mitochondrienmembran unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen.

Es sollte untersucht werden, ob sich die Carbonsäuren Citrat, Malat, α-Ketoglutarat, Glutamat und Aspartat nach dem pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran verteilen. Dazu wurden mitochondriale und zytosolische Gehalte dieser Metabolite im gefütterten und gehungerten Zustand bestimmt und daraus die Konzentrationsgradienten mitochondrial / zytosolisch berechnet (Tabelle 11). Es stellte sich heraus, daß im gefütterten Zustand Malat, Citrat und α-Ketoglutarat in den Mitochondrien akkumuliert waren, während sich Glutamat und Aspartat im Zytosol anreicherten. Bei Infusion von NH_4Cl war ein Anstieg des mitochondrialen Aspartats zu beobachten, wodurch der Konzentrationsgradient von Aspartat zwischen Mitochondrien und Zytosol aufgehoben wurde. Im Hungerzustand waren Citrat und α-Ketoglutarat in den Mitochondrien akkumuliert, und Malat, Glutamat und Aspartat im Zytosol.

Tabelle 11: Konzentrationsgradienten mitochondrial/zytosolisch von Di- und Tricarbonsäuren in verschiedenen Stoffwechselzuständen. Mittelwerte aus 3* - 5 Experimenten ± SEM

Expt.	Gefüttert;	Gefüttert; NH_4Cl	Gehungert;
	Gradient mitochondrial/zytosolisch		
Malat	3.2 ± 0.5	11.0 ± 4.0	0.52 ± 0.13
α-Ketoglutarat	4.3 ± 1.1	2.0 ± 0.6	2.6 ± 0.5
Citrat	9.0 ± 1.9	6.0 ± 2.0	5.7 ± 2.4
Glutamat	0.37± 0.10	0.13 *	0.69 ± 0.25
Aspartat	0.28± 0.10	1.3 ± 0.5	0.73 ± 0.17

Sowohl aus der subzellulären Verteilung der Indikatorsäure DMO, als auch aus der Verteilung von Citrat, Malat, α-Ketoglutarat, Glutamat und Aspartat (Tabelle 11) wurden pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran nach Gleichung I berechnet (Tabellen 12 und 13). Der pH-Gradient (mitochondrial/zytosolisch), berechnet aus der Verteilung des

Tabelle 12: pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran berechnet aus den Konzentrationsgradienten der Di- und Tricarbonsäuren. Zur Berechnung wurden die Werte aus Tabelle 10 benutzt.

Expt.	Gefüttert;	Gefüttert; NH_4Cl	Gehungert;

$$pH_{mit.} - pH_{zyt.} = \frac{1}{n} \lg \frac{[A^{n-}]_{mit.}}{[A^{n-}]_{zyt.}}$$

Malat	0.25	0.52	- 0.18
α-Ketoglutarat	0.29	0.15	0.13
Citrat	0.30	0.26	0.30
Glutamat	- 0.48	- 0.44	- 0.21
Aspartat	- 0.68	0.06	- 0.14

DMO, war im Futterzustand 0.3 und im Hungerzustand 0.6 pH-Einheiten. Auch bei Perfusion mit NH_4Cl war der pH-Gradient über die Mitochondrienmembran gegenüber (F) erhöht. Das Zytosol war stets saurer als das Perfusat, mit Ausnahme von (FN); hier hatte das Zytosol denselben pH-Wert wie das Perfusat. Die mitochondriale Matrix war in (F), (H) und (FN) alkalischer und in (FOl) und (FDNP) saurer als das Zytosol. Die Ursachen der Umkehrung des pH-Gradienten in (FOl) und (FDNP) werden in der Diskussion besprochen (4.4).

Tabelle 13: pH- Werte in Mitochondrien und Zytosol perfundierter Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen. Mittelwerte aus 4 - 5 Experimenten ± SEM

Expt.	Gefüttert;	Gefüttert; Pyruvat 1mM	Gefüttert; NH_4Cl 2mM	Gefüttert; DNP	Gefüttert; Oleat 0.3 mM	Gehungert;
pH Perfusat	7.40	7.40	7.40	7.40	7.40	7.40
pH Zytosol	6.99	7.35	7.43	7.24	7.18	7.17
pH Mitochondrien	7.29	7.82	7.97	6.81	7.04	7.77
$pH_{zyt.-perf.}$	-0.41 ±0.04	-0.05 ±0.01	0.003 ±0.001	-0.25 ±0.04	-0.22 ±0.04	-0.23 ±0.04
$pH_{mit.-zyt.}$	0.30 ±0.01	0.47 ±0.05	0.57 ±0.05	-0.43 ±0.21	-0.15 ±0.05	0.60 ±0.03

Vergleicht man diese Δ pH-Werte mit den Δ pH-Werten, die aus der subzellulären Verteilung der Di- und Tricarbonsäuren erhalten wurden (Tabelle 12), so stellt man folgendes fest: Glutamat und Aspartat scheinen sich nicht nach dem pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran zu verteilen (4.3.2); es lassen sich umgekehrte pH-Gradienten berechnen.Citrat, Malat und α-Ketoglutarat verteilen sich im Futterzustand (F) nach dem ΔpH über die Mitochondrienmembran, nicht aber im Hungerzustand und bei Perfusion mit NH_4Cl (FN); in diesen Experimenten errechnen sich andere Δ pH-Werte aus der subzellulären Verteilung von Citrat, Malat und α-Ketoglutarat, als aus der subzellulären Verteilung von DMO.

3.5 Subzelluläre ATP- und ADP-Gehalte in isolierten Hepatozyten.

Der Vergleich der beiden Fraktionierungsmethoden, der Digitonin-Methode (Zuurendonk & Tager, 1974) und der Fraktionierungsmethode in nicht-wässrigen Medien (Elbers et al., 1974),läßt sich nur an isolierten Hepatozyten durchführen,

da die Digitonin-Methode nicht auf isoliertes Gewebe anwendbar ist. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung von 6 Leberzellpräparationen zusammengestellt. Beide Methoden ergeben praktisch dasselbe Ergebnis. Demnach ist in isolierten Hepatozyten der mitochondriale ATP/ADP-Quotient wesentlich höher (etwa 10-fach) als in der perfundierten Leber. Die zytosolischen Quotienten sind ähnlich wie in perfundierter Leber (Tabellen 8 und 9).

3.6 Subzelluläre ATP-und ADP-Konzentrationen in der Leber in vivo.

Die mitochondriale ATP-Konzentration ist in der Leber in vivo, auch im gefütterten Zustand, höher als in perfundierter Leber (Tabelle 15), während die mitochondrialen ADP-Konzentrationen etwa gleich hoch sind. Als Folge davon ist der mitochondriale ATP/ADP-Quotient in vivo höher als in perfundierter Leber, jedoch nur halb so hoch wie in isolierten Hepatozyten. Die zytosolischen Quotienten unterscheiden sich nicht wesentlich von den Werten, die für isolierte Hepatozyten und perfundierte Leber unter ähnlichen Stoffwechselbedingungen gefunden wurden. Die Befunde wurden in Lebern erhalten, die entweder narkotisiert worden waren oder die mit der Doppelbeil-Methode getötet worden waren (Faupel et al., 1972). Es ergeben sich keine grundlegenden

Tabelle 14: Subzelluläre Verteilung von ATP und ADP in isolierten Hepatozyten fraktioniert mit der Digitonin Methode und mit der nicht-wässrigen Fraktionsmethode. Mittelwerte aus 6 verschiedenen Präparationen ± SEM

Isolierte Hepatozyten wurden 20 min. wie im Methodenteil beschrieben, inkubiert und darauf wurden sie nach beiden Verfahren fraktioniert. Die Ergebnisse, die mit der Digitonin Methode erhalten wurden, stellen Messungen in der unfraktionierten Zellsuspension, der Pelletfraktion (mitochondrial) und dem Überstand (zytosolisch) dar. Die Ergebnisse gezeigt für die nicht-wässrige Fraktionsmethode wurden nach Frierstop des großen Teils des Inkubationsansatzes und darauffolgender Lyophilisierung und Fraktionierung erhalten. Die mitochondrialen und zytosolischen Werte wurden durch Extrapolation auf reine Mitochondrien und reines Zytosol errechnet entsprechend der Verteilung der Leitenzyme Citratsynthase und Phosphoglyceratkinase.
(Aus Soboll et al., 1980a)

Gewebsgehalt (µmol/g Trockengewicht)	Digitonin Methode	Nicht-wässrige Fraktionsmethode
ATP	6.23 ± 0.52	6.98 ± 0.57
ADP	1.25 ± 0.10	1.60 ± 0.09
ATP/ADP	5.10 ± 0.44	4.37 ± 0.32
Mitocnondrialer Gehalt (µmol/g Trockengewicht)		
ATP	1.22 ± 0.13	1.16 ± 0.10
ADP	0.61 ± 0.07	0.53 ± 0.06
ATP/ADP	2.07 ± 0.21	2.26 ± 0.22
Zytosolischer Gehalt (µmol/g Trockengewicht)		
ATP	4.80 ± 0.62	5.82 ± 0.58
ADP	0.76 ± 0.06	1.07 ± 0.10
ATP/ADP	6.58 ± 0.97	5.70 ± 0.66

Tabelle 15: Verteilung von ATP und ADP in der Rattenleber in vivo.
Mittelwerte aus 4 Experimenten ± SEM, (aus Schwenke et al., 1981)

	Nicht anaesthesierte Ratten		Anaesthesierte Ratten	
	gefüttert	gehungert	Pentobarbital	Ketamin
Gesamtgehalt		(µmol/ g Trockengewicht)		
ATP	12.4 ± 0.65	9.97 ± 0.39	9.88 ± 0.28	11.3 ± 0.56
ADP	3.19± 0.16	3.04 ± 0.12	3.14 ± 0.11	2.67± 0.25
ATP/ADP	3.90± 0.21	3.29 ± 0.16	3.06 ± 0.22	4.30± 0.39
Mitochondrien		[mM]		
ATP	7.49± 0.73	7.92 ± 0.93	4.21 ± 0.82	6.42± 0.60
ADP	8.98± 1.84	7.62 ± 0.84	7.43 ± 0.73	7.55± 0.97
ATP/ADP	0.92± 0.18	1.04 ± 0.03	0.55 ± 0.06	0.86± 0.04
Zytosol		[mM]		
ATP	6.18± 0.62	5.33 ± 0.25	5.62 ± 0.36	5.91± 0.41
ADP	0.86± 0.23	0.93 ± 0.08	0.99 ± 0.12	0.69± 0.19
ATP/ADP	6.94± 0.59	5.91 ± 0.65	5.83 ± 0.40	10.3 ± 2.1

Unterschiede, jedoch liegen die Werte der mit Nembutal behandelten Tiere in beiden Kompartimenten und im Gesamtwert etwas niedriger.

3.7 Subzelluläre ATP/ADP-Quotienten im Herzen.

Die Gehalte von ATP und ADP im Herzen wurden am isolierten Meerschweinchenherzen und in kultivierten Rattenherzfibroblasten in der ganzen Zelle und im mitochondrialen und zytosolischen Kompartiment bestimmt (Tabelle 16). Der Gehalt an ATP ist in beiden Kompartimenten im Herzen höher als in der Leber. In den Fibroblastenzellen ist der ATP-Gehalt ähnlich wie in der Leber, jedoch enthalten diese Kreatinphosphat und Kreatin, was in der Leber praktisch nicht vorkommt, wenn auch die Gehalte niedriger als im Herzmuskel sind. Die mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten liegen zwischen 2 und 4, also wesentlich höher als in Leber. Kreatinphosphat kommt nicht in den Mitochondrien vor, während ein beträchtlicher Anteil des Kreatins auch in den Mitochondrien gefunden wurde. Der zytosolische ATP/ADP-Quotient ist nur wenig höher als der mitochondriale, er stellt nicht den Quotienten aus freiem ATP und freiem ADP dar, da im Herz- und Muskelgewebe ein großer Teil des zytosolischen ADP an Actin und Myosin gebunden ist (Seraydarian et al., 1962). Im Gegensatz dazu ist der Gehalt an Kreatinphosphat und Kreatin in Fibroblastenzellen niedriger als der Gehalt an Adeninnukleotiden; hier spielt das Kreatinsystem offensichtlich nur eine untergeordnete, oder gar keine Rolle. Berechnet man die freien zytosolischen ATP/ADP-Quotienten aus den zytosolischen Kreatinsphosphat- und Kreatinkon-

Tabelle 16: Kompartimentierung der Adeninnukleotide im Herzen.

1) Werte ergänzt aus (Soboll & Bünger, 1981)
2) Werte in Konzentrationen umgerechnet, aus (Soboll et al., 1979)
3) Siehe Tabelle 22 (3)

	Isoliertes, arbeitendes Meerschweinchenherz [1]		Kultivierte Rattenherzfibroblasten [2]
Gewebsgehalt (µmol/g Trockengewicht)	Pyruvat 1 mM	Noradrenalin 0.08 uM	Glukose 5 mM
ATP	19.2 ± 4.0	21.0 ± 5.3	12.4 ± 0.77
ADP	4.2 ± 2.0	5.5 ± 2.1	2.5 ± 0.28
ATP/ADP	5.1 ± 1.5	4.0 ± 1.1	4.9 ± 0.50
Kreatinphosphat	32.0 ± 8.5	32.7 *	4.7 *
Kreatin	18.8 + 6.8	24.0 *	2.0 *
Phosphat	19.2 ± 5.6	18.7 ±10.4	3.5 *
Kreatinphosphat/Kreatin	1.8 ± 0.5	1.4 *	2.4 *
Mitochondriale Konzentration [mM]			
ATP	5.6 ± 0.9	7.2 ± 1.2	6.3 ± 1.0
ADP	1.9 ± 0.5	1.7 ± 0.3	2.8 ± 0.4
ATP/ADP	3.3 ± 0.6	4.3 ± 0.4	2.3 ± 0.4
Kreatinphosphat	< 0.4	< 0.4	< 0.1
Kreatin	6.3 ± 1.8	13.5 *	0.4 *
Phosphat	5.3 ± 0.8	4.3 ± 0.9	1.6 *
Kreatinphosphat/Kreatin	———	———	———
Zytosolische Konzentration [mM]			
ATP	10.0 ± 0.5	12.4 ± 0.5	6.5 ± 0.66
ADP	1. 3± 0.1	2.7 ± 0.3	1.2 ± 0.15
ATP/ADP	7.8 ± 0.4	5.2 ± 0.8	5.6 ± 0.60
Kreatinphosphat	18.3 ± 2.0	21.6 *	2.3 *
Kreatin	8.5 ± 1.2	15.8 *	1.0 *
Phosphat	9.5 ± 1.0	12.1 ± 2.2	1.7 *
Kreatinphosphat/Kreatin	2.2 ± 0.3	1.2 *	2.4 *
ATP/ADP frei [3]	122	60	105

* Mittelwert aus 2 Messungen

zentrationen und der Massenwirkungskonstante der Kreatinkinasereaktion, so erhält man ATP/ADP-Quotienten zwischen 60 und 120. Offensichtlich arbeitet das ATP-System im Herzen auf einem viel höheren energetischen Niveau als in der Leber.

4. Diskussion

4.1 Das experimentelle Modell.

Die Untersuchung isolierter Mitochondrien kann nur modellhaft Aussage über das Verhalten von Mitochondrien in der intakten Zelle erbringen. Um ein Bild vom Stoffwechselzustand der Mitochondrien und des Zytosols in vivo zu erhalten, ist eine Methode erforderlich, bei der Stoffechselveränderungen während der Aufarbeitung des zellulären Materials verhindert werden. 1932 wurde (Behrens, 1932) eine Methode entwickelt, Zellkerne aus friergestopptem Gewebe in nicht-wässrigen Medien zu isolieren. Durch die Anwendung von Frieren und Trocknen und Vermeidung des Kontaktes mit Wasser während der Auftrennung wird eine Veränderung des Stoffwechselzustandes des Gewebes verhindert. Diese Methode ist in der Folgezeit zur Gewinnung von Zellkernen (Siebert, 1961; Allfrey et al., 1952) und Chloroplasten (Stocking 1959; Heber, 1957; Thalacker & Behrens, 1959) verwendet worden.

Siebert (1965,1973) fand heraus, daß der Kernraum sich bezüglich löslicher Enzyme und Metabolite wie das Zytosol verhält, da die Kernmembran große Poren besitzt, die sogar eine freie Diffusion von löslichen Enzymen ermöglicht. Ferner zeigte er, daß bei der Fraktionierung von Gewebe in organischen Lösungsmitteln ein großer Teil der löslichen

Enzyme keinen Schaden nimmt, wie z.B. die Enzyme der Glykolysekette, und daß trotz Zerkleinerung der Kompartimente der Inhalt der einzelnen Kompartimente nicht herausgelöst und umverteilt wird. Dies wird durch die elektrostatischen Anziehungskräfte von Proteinen und Metaboliten in der unpolaren Umgebung verhindert.

Auf den Untersuchungen Sieberts aufbauend, wurde die Methode zur Bestimmung von Metabolitgehalten im mitochondrialen und zytosolischen Kompartiment verschiedener Gewebe in Heptan-CCl_4-Gemischen entwickelt (Elbers et al.,1974). Etwa zur gleichen Zeit wurde eine zweite Fraktionierungsmethode entwickelt (Zuurendonk & Tager, 1974);bei dieser Methode wird das Cholesterin der Plasmamembran isolierter Leberzellen durch Komplexbildung mit Digitonin herausgelöst (Digitonin-Methode), danach wird die Membran durchlässig und die Mitochondrien können zusammen mit den Membranen (Partikelfraktion) durch eine Silikonölschicht in Perchlorsäure zentrifugiert werden, während das Zytosol im Überstand bleibt. Die Fraktionierung erfolgt bei $-5^{o}C$ bis $+5^{o}C$, damit die Stoffwechselaktivität während der Trennung möglichst gering ist. Die Zeit von der Zugabe des Digitonin-Trennmediums bis zum metabolischen Stopp der Fraktionen mit Perchlorsäure beträgt 30-60 s, es dauert also wesentlich länger als ein Frierstopp. Dennoch ergab der Vergleich der Bestimmung subzellulärer Adeninnukleotidgehalte in isolierten Hepatozyten mit beiden Methoden identische Ergebnisse (Tabelle 14). Dies

zeigt, daß beide Methoden für die Bestimmung der subzellulären Gehalte von Adeninnukleotiden gleich gut anwendbar sind. Der Vorteil der Digitonin-Methode ist, daß die Fraktionierung einen geringen methodischen Aufwand erfordert. Auf der anderen Seite ist die Fraktionsmethode in nicht-wässrigen Medien auf intakte Organe anwendbar (Tabelle 17).

Tabelle 17: Methoden zur Fraktionierung der Zelle in Mitochondrien und ihre Anwendung unter Erhaltung des Stoffwechselzustandes der Zelle.

Methode	Anwendungsmöglichkeiten	bisherige Verwendung
Digitonin-Methode	nur isolierte Zellen	isolierte Hepatozyten, Nierentubuli (Versuch)
Scherkraft-Methode	nur isolierte Zellen	isolierte Hepatozyten
Fraktionierung in nicht-wässrigen Medien	alle Gewebe mit relativ homogener Zellpopulation	isolierte Hepatozyten, kultivierte Rattenherzfibroblasten, perfundierte Rattenleber, perfundiertes Rattenherz (Langendorff) perfundiertes Meerschweinchenherz (arbeitend), Leber in vivo, Skelettmuskel der Ratte, isolierte Zellkerne aus Rattenleber, isolierte Chloroplasten aus Spinat.

Die Isolation von Zellen aus Organen bereitet häufig Schwierigkeiten, z.B. bei Herz und Skelettmuskel, ferner gibt es z.B. in der Leber bezüglich des Energiestoffwechsels Unterschiede zwischen dem intakten Organ und der isolierten Zelle (siehe Kapitel 4.7). Zur Untersuchung der Regulation des Energiestoffwechsels in vivo ist daher das intakte Organ vorzuziehen.

Bei der Scherkraft -Methode (Tischler et al., 1977) werden isolierte Zellen unter Anwendung von Druck durch eine enge Kanüle gepreßt (Scherkräfte) und dadurch die Zellmembran aufgerissen. Die Mitochondrien werden vom Zytosol wie bei der Digitonin-Methode durch Silikonölzentrifugation abgetrennt. Tabelle 17 zeigt eine Zusammenstellung der Anwendungsmöglichkeiten der 3 Methoden.

Mit den gezeigten Fraktionierungsmethoden können nur Gehalte bestimmt werden, nicht die Konzentrationen frei gelöster Metabolite, da das Ionenmilieu der Zellkompartimente und die Menge der an Protein gebundenen oder mit Metallen komplexierten Metaboliten in vivo nicht bekannt ist Im Zytosol z.B. ist über 90% des gesamten NADH an Dehydrogenasen gebunden, in Muskelzellen mehr als 90% des ADP an Actin und Myosin. In isolierten Hepatozyten wurde jedoch mit der Metabolitindikatormethode ein ähnliches zytosolisches Phosphorylierungspotential berechnet, wie man bei der

direkten Bestimmung durch Fraktionierung der Zelle mit der Digitonin-Methode erhält. Daraus kann man schließen, daß in der Leberzelle die gemessenen zytosolischen ATP/ADP-Quotienten den Quotienten aus freiem ATP und ADP nahekommen.

In neuerer Zeit ist die Entwicklung sogenannter "nicht-invasiver" spektroskopischer Methoden fortgeschritten. Bei diesen Verfahren werden Organe oder Körperteile eines lebenden Tieres oder ganze lebende Tiere in Meßgeräte eingebracht, welche bestimmte Metabolite, wie z.B. fluoreszierende oder absorbierende Verbindungen (Oberflächenfluoreszenz, Schnitger et al., 1965; Scholz & Bücher, 1965; Organabsorptionsspektrophotometrie, Brauser, 1968, Sies & Brauser, 1980) oder Metabolite mit Kernspin (^{13}C, ^{1}H, ^{31}P), (Kernresonanzspektroskopie, Hoult et al., 1975; Cohen et al., 1979; Matthews & Radda, 1981) auch in intakten Geweben selektiv erfassen können. Mit Hilfe solcher Techniken kann man die freien Formen eines Metaboliten von den gebundenen Formen unterscheiden. Die Technik der Kernresonanzspektroskopie ist jedoch noch nicht so empfindlich, daß man z.B. mitochondriale Metabolite erfassen kann.

In Ermangelung einer "idealen Technik" zur Bestimmung subzellulärer Metabolitkonzentrationen in vivo muß man versuchen, mit einer Vielzahl von experimentellen Ansätzen Informationen über den Zustand der Zelle in vivo zu sammeln, um so den wirklichen Verhältnissen näher zu kommen.

4.2 Subzelluläre Adeninnukleotidverteilung in Beziehung zu ATP-Synthese und -Verbrauch in der Zelle.

Die Gewebsgehalte von ATP und ADP unterliegen einer biologischen Streuung und sagen für sich gesehen wenig über den Energiezustand der Zelle aus. In die energetische Betrachtung geht das Phosphorylierungspotential des ATP, $\Delta G_{oATP} + RT \ln[ADP] \times [P]/[ATP]$ ein. In perfundierter Leber wurde gezeigt, daß die mitochondrialen und zytosolischen Phosphatkonzentrationen in verschiedenen Stoffwechselzuständen weitgehend unverändert waren (Tabelle 10). Daher wird in den folgenden Betrachtungen nur auf Veränderungen der subzellulären ATP/ADP-Quotienten Wert gelegt. Dies schließt nicht aus, daß bei bestimmten Bedingungen in der Leber (Erecinska et al.,1977; Sestoft, 1979) und besonders im Herzen bei erhöhter Arbeit (Kauppinen et al., 1980, Soboll & Bünger, 1981) Änderungen der subzellulären Phosphatkonzentrationen das Phosphorylierungspotential beeinflussen (siehe auch 4.5).

4.2.1 Zytosolische Adeninnukleotide

4.2.1.1 Regulation der Glykolyse

Bei Veränderung des Stoffwechselzustandes, z.B. durch Infusion bestimmter Substrate, stellt die perfundierte Leber sowohl durch Änderung der Geschwindigkeit von Glykolyse und

Atmungskette als auch durch Änderung der subzellulären ATP- und ADP-Konzentrationen ein neues energetisches Fließgleichgewicht ein. Dabei spiegeln die zytosolischen Adeninnunkleotidkonzentrationen, besonders die zytosolischen ATP/ADP-Quotienten, den energetischen Zustand der Zelle wider (Tabellen 7,9). In Abb. 13 ist der zytosolische ATP/ADP-Quotient verschiedener experimenteller Bedingungen gegen die Aktivität der Glykolyse aufgetragen. Mit steigender Glykolyserate steigt auch der zytosolische ATP/ADP-Quotient. Dies ist im Hinblick auf die in vitro Versuche, die an Phosphofruktokinase (PFK) gemacht wurden, erstaunlich. Es wurde eine Hemmung der PFK durch ATP und eine Aktivierung durch ADP und AMP gezeigt. Wie aus den Tabellen 7 und 9 ersichtlich, ist die Glykolyseaktivität hoch, wenn die ATP-Konzentrationen hoch und die ADP- und AMP-Konzentrationen niedrig sind, und niedrig, wenn sich die Adeninnukleotide umgekehrt verhalten. Demnach erscheinen die zytosolischen Adeninnukleotidkonzentrationen ein Resultat der Aktivität der Glykolysekette zu sein und weniger eine regulatorische Funktion auszuüben. Lediglich bei einem starken Absinken des zytosolischen ATP/ADP-Quotienten, z.B. bei Zugabe von Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette, wird die Glykolyse durch das zytosolische Adeninnukleotidsystem reguliert (FCat, FAm, FDNP, Tabelle 6). Es handelt sich hier anscheinend um eine kinetische Kontrolle und nicht um eine thermodynamische Kontrolle durch das zytosolische Phospho-

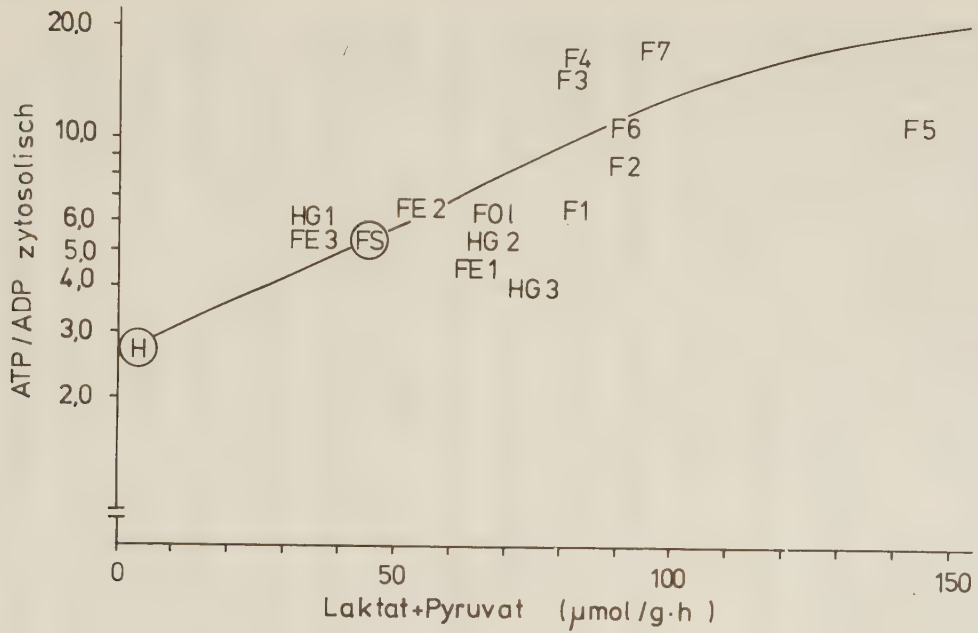


Abb. 13: Beziehung zwischen der Aktivität der Glykolyse und dem zytosolischen ATP/ADP-Quotienten in perfundierter Leber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen. Symbole siehe Tabelle 6; die Werte für die Auftragung wurden den Tabellen 7 und 9 entnommen.

rylierungspotential, da der Abbau von Glukose zu Laktat ein praktisch irreversibler Prozeß ist. Neuere Arbeiten diskutieren auch Fruktose 1,6,-Diphosphat und Glukose 1,6,-Diphosphat als wichtige Regulatoren der PFK (Hue, 1981, Beitner, 1979). Ferner scheint auch die hormonelle Regulation der Glykolyse eine größere Bedeutung zu haben als die direkte Kontrolle durch zytosolische Adeninnukleotidkonzentrationen (Hue, 1981).

4.2.1.2 Adenylatkinasegleichgewicht

Die Reaktionskonstante der Adenylatkinasereaktion, berechnet aus den zytosolischen Adeninnukleotidkonzentrationen, liegt bei 0.8 (Tabelle 18). Dieser Wert ist ähnlich den in vitro bestimmten Werten (Markland & Wadkins, 1966, Eggleston & Hems, 1952, Siekevitz & Potter, 1953) und zeigt, daß die Adenylatkinase, die an der äußeren Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, dank ihrer hohen Kapazität in der Lage ist, das Reaktionsgleichgewicht herzustellen. Stucki (1980a) hat auf die Rolle der Adenylatkinase als Pufferenzym des zytosolischen ATP-Systems in der Leber hingewiesen. Da die Leber kein Kreatinsystem besitzt, kann die Adenylatkinase dessen Funktion übernehmen und ein Absinken des zytosolischen ATP-Spiegels verhindern. Diese Rolle kann in der Leber auch zusätzlich die Glykolyse übernehmen; wie bereits besprochen, wird bei Infusion von Inhibitoren der mitochondrialen ATP-Synthese die Glykolyse stark stimuliert.

Dennoch ist ein zweites Puffersystem notwendig, da die Glykolyse auch anderen Kontrollmechanismen unterliegt (siehe 3.2 und 4.2.1.1). In den Mitochondrien liegt die errechnete Massenwirkungskonstante um eine Größenordnung höher. Im Matrixraum wird die Adenylatkinasereaktion durch Kombination der GTP-AMP-Phosphotransferase und Nukleotiddiphosphokinasereaktionen katalysiert.

Tabelle 18: Berechnung der Massenwirkungskonstante der Adenylatkinase Reaktion. Mittelwerte ± SEM , aus (Soboll et al., 1978)

Expt.	Stoffwechselbedingung	n	$[ADP]^2 / [ATP] \times [AMP]$	
			Mitochondrien	Zytosol
F	gefüttert; -	7	14 ± 2	0.78 ± 0.31
FS	gefüttert; Glukose etc.	6	13 ± 3	0.72 ± 0.31
FE	gefüttert; Äthanol	3	8	0.83
H	gehungert; -	5	9 ± 2	0.75 ± 0.11
HL	gehungert; Laktat	4	9 ± 2	0.77 ± 0.11
HD	gehungert; Dihydroxyaceton	3	9	1.03
HG	gehungert; Glukose	3	9	0.60
FCat	gefüttert; Carboxyatraktylosid	4	1 ± 1	0.41 ± 0.22
FDNP	gefüttert; DNP	4	4 ± 2	0.85 ± 0.35
FAm	gefüttert; Amytal	4	9 ± 5	0.53 ± 0.11

1) GTP + AMP $\rightleftharpoons$ GDP + ADP

2) GDP + ATP $\rightleftharpoons$ ADP + GTP

$$K = \frac{[ADP^2]}{[ATP \times AMP]}$$

Die Aktivität der Nukleosiddiphosphokinase in den Mitochondrien ist jedoch gering (Söling, 1981), so daß nicht erwartet werden kann, daß die Adenylatkinasereaktion in den Mitochondrien ins Gleichgewicht kommt.

4.2.2 Mitochondriale ATP/ADP-Quotienten

In der oxidativen Phosphorylierung werden sowohl die ATP-Synthese als auch der Adeninnukleotidtransport von der Elektronentransportkette (also von der Oxidationsreaktion) getrieben (Abb.1). Die beiden Prozesse üben einen entgegensetzten Effekt auf die mitochondrialen Konzentrationen des ATP und ADP aus, indem die ATP-Synthase den ATP-Spiegel anhebt und den ADP-Spiegel senkt, während durch die Translokation ein umgekehrter Effekt erzielt wird. Es ist die Frage, wie stark jeder der beiden Prozesse die mitochondrialen ATP und ADP-

Konzentrationen im stationären Zustand beeinflußt. Wären beide Reaktionen im Gleichgewicht mit der "Protonmotive Force", würde ein relativ hoher mitochondrialer und ein noch höherer zytosolischer ATP/ADP-Quotient resultieren, dem kontrollierten Zustand isolierter Mitochondrien vergleichbar. Es wären auch zwei andere Extremfälle denkbar. Wenn die Geschwindigkeit der ATP-Synthese die Geschwindigkeit des Transportes übersteigt, würde das mitochondriale ATP-System mit der Elektronentransportkette ins Gleichgewicht kommen. Eine Änderung des energetischen Zustandes der Mitochondrien würde demnach auch durch eine Änderung des mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten angezeigt. Wenn andererseits der ATP-Transport die Geschwindigkeit der mitochondrialen ATP-Synthese übersteigt, könnte eine Äquilibrierung des mitochondrialen ATP-Systems mit dem Elektronentransport in der Atmungskette nicht erreicht werden. Der energetische Zustand der Mitochondrien und damit der ganzen Zelle würde von dem Verhältnis zwischen mitochondrialen und zytosolischen ATP-Systemen angezeigt werden, da der ATP-Export die Erhöhung des zytosolischen ATP/ADP-Quotienten bewirkt. Aus den Änderungen der mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten in perfundierter Leber , die bei Änderung des energetischen Zustandes der Zelle (Tabelle 9) auftreten, kann man folgende Schlüsse ziehen: In der perfundierten Leber gibt es keine sinnvolle Korrelation zwischen mitochondrialem ATP/ADP-Quotienten und Aktivität der Atmung. Es ist eine umgekehrte

Relation zu beobachten. d.h., je höher die Aktivität der Atmungskette ist, desto höher ist der mitochondriale ATP/ADP-Quotient. Eine Erhöhung der mitochondrialen Atmung sollte zu beobachten sein, wenn viel ATP verbraucht wird, also der energetische Zustand der Zelle erniedrigt wird. Der mitochondriale ATP/ADP-Quotient spiegelt somit nicht den energetischen Zustand der Zelle wider. Trägt man mitochondriale und zytosolische ATP/ADP-Quotienten, die unter verschiedenen energetischen Zuständen gemessen wurden, gegen den korrespondierenden Sauerstoffverbrauch der Leber (Tabelle 7) auf (Abb.14). kann man erkennen, daß die Atmungsaktivität umso höher ist, je kleiner das Verhältnis mitochondrialer und zytosolischer ATP/ADP-Quotienten ist. Allerdings gibt es einige Ausnahmen. Bei Hemmung des Adeninnukleotidtransportes (FCat) ist die Wechselwirkung zwischen mitochondrialen und zytosolischen Adeninnukleotiden nicht möglich.Bei Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch Amytal (FAm) ist die Wechselwirkung zwischen subzellulären Adeninnukleotidsystemen und der Atmungsaktivität durch Hemmung der Atmungskette gestört. Die Atmungsaktivität spiegelt hier nicht den energetischen Zustand der Zelle wider, während dies für das Verhältnis der ATP/ADP-Quotienten zutrifft, das gegenüber dem Kontrollexperiment (F) verringert ist.

Auch in Lebern gehungerter Ratten ist eine Verringerung des Verhältnisses der ATP/ADP-Quotienten nicht von einer ent-

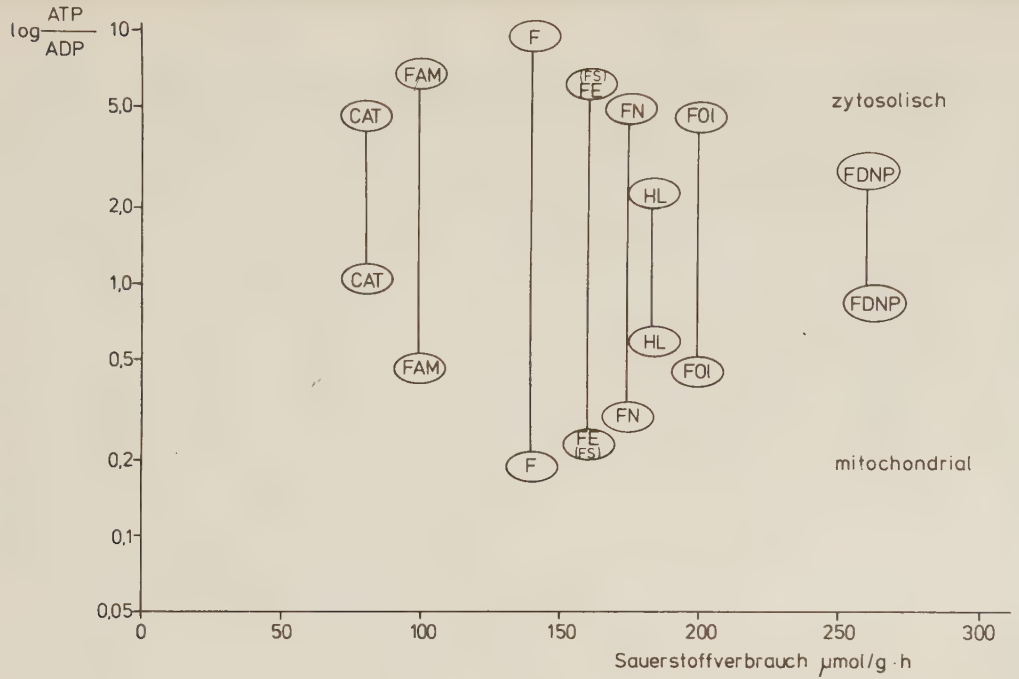


Abb. 14: Beziehung zwischen dem Sauerstoffverbrauch der Leber und den mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten. Symbole siehe Tabelle 6; Werte für die Auftragung wurden den Tabellen 7 und 9 entnommen.

sprechenden Steigerung des Sauerstoffverbrauchs begleitet. (Abb.14, Beispiel HL). Es wäre möglich, daß im Hungerzustand die Kapazität des Adeninnukleotidtransportes nicht ausreicht, um eine dem energetischen Zustand der Zelle entsprechende Erhöhung des zytosolischen ATP/ADP-Quotienten über den mitochondrialen Quotienten zu ermöglichen. Eine Verringerung der Transportkapazität könnte durch Hemmung des Translocators durch langkettige Fettsäure-CoA-Ester erfolgen, die wegen des erhöhten Abbaus endogener Fettsäuren im Hungerzustand ansteigen (Williamson et al., 1969). In isolierten Mitochondrien sind langkettige Fettsäure-CoA-Ester potente Hemmstoffe der Adeninnukleotidtranslokation (Shug et al., 1971; Bell et al., 1980). Seitz fand auch an Leber in situ einen Anstieg der Fettsäure-CoA-Ester bei gleichzeitigem Abfall des gesamten ATP/ADP-Quotienten, der vorwiegend den zytosolischen ATP/ADP-Quotienten widerspiegelt (Seitz et al., 1977).

Es ist daher anzunehmen, daß die Kapazität des Adeninnukleotidtranslokators nicht sehr viel höher ist als die der mitochondrialen ATP-Synthase. An isolierten Hepatozyten (Akerboom et al., 1977; Stubbs et al., 1978) wurde gezeigt, daß selbst kleinste Mengen an Carboxyatractylosid zytosolische Stoffwechselprozesse wie Glukoneogenese oder Harnstoffsynthese, die ATP in diesem Kompartiment verbrauchen, hemmen, was darauf hindeutet, daß der Adeninnukleotidtranslokator wenig überschüssige freie Kapazität hat.

Ferner wurde an isolierten Mitochondrien aus Herz und Leber gezeigt, daß die Kapazität von ATP-Synthase und Adeninnukleotidtranslokator bei Temperaturen über 20°C in derselben Größenordnung liegen (Heldt & Klingenberg, 1968; Klingenberg, 1975). Die Befunde an der intakten Leber unterstützen damit das Konzept einer Regulation des Energiestoffwechsels über die kinetische Kontrolle des Adeninnukleotidtranslokators (Akerboom et al.,1977; Lemasters et al.,1979; Davis et al.,1975).

4.2.3 Wechselwirkung zwischen mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten; Die Rolle des Adeninnukleotidtranslokators.

Eine Veränderung des Verhältnisses mitochondrialer und zytosolischer ATP/ADP-Quotienten ist auf zweierlei Weise möglich: Entweder verändert sich nur der mitochondriale bzw. der zytosolische ATP/ADP-Quotient, oder es verändern sich beide. Wenn die Kapazität des Translokators höher ist als die der mitochondrialen ATP-Synthese, wie in der perfundierten Leber, sollte der Adeninnukleotidtranslokator das Verhältnis von zytosolischen und mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten zueinander bestimmen. Der Adeninnukleotidtransport ist, wie in der Einleitung erwähnt, asymmetrisch im Austausch gegen ADP wird ATP ins Zytosol gepumpt.

Daraus ergibt sich unter den gegebenen Bedingungen eine Zunahme des zytosolischen ATP/ADP-Quotienten und eine Abnahme des mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten. Diese umgekehrte Beziehung konnte für die Experimente in perfundierter Leber gezeigt werden und ist in Abb. 15 graphisch dargestellt. Sie wird auch in der Leber in vivo (Tabelle 15) und im isolierten Herzen beobachtet. So ist z.B. im perfundierten Rattenherzen (Kauppinen et al.,198o,Tabelle 22) bei künstlichem Herzstillstand durch Kaliuminfusion (weniger Kontraktion, dadurch weniger ATP-Verbrauch) der zytosolische ATP/ADP-Quotient im Vergleich zum schlagenden Herzen erhöht und der mitochondriale ATP/ADP-Quotient erniedrigt. Bei isolierten arbeitenden Meerschweinchenherzen war bei einer Erhöhung der Herzarbeit durch Noradrenalin der zytosolische ATP/ADP-Quotient erniedrigt und der mitochondriale Quotient erhöht (Tabelle 16). Obwohl im Herzen die ATP/ADP-Quotienten generell höher sind als in der Leber, scheint das Verhältnis der Geschwindigkeiten der mitochondrialen ATP-Synthese und Adeninnukleotidtranslokation ähnlich zu sein wie in Leber und in isolierten Mit ochondrien (Klingenberg, 1975; Heldt & Klingenberg, 1968).

Beim Export von ATP^{4-} im Austausch gegen ADP^{3-} wird eine negative Ladung ins Zytosol transportiert. Da hierbei die Protonmotive Force verringert wird, ist der Adeninnukleotidtransport ein Energie verbrauchender Prozess.

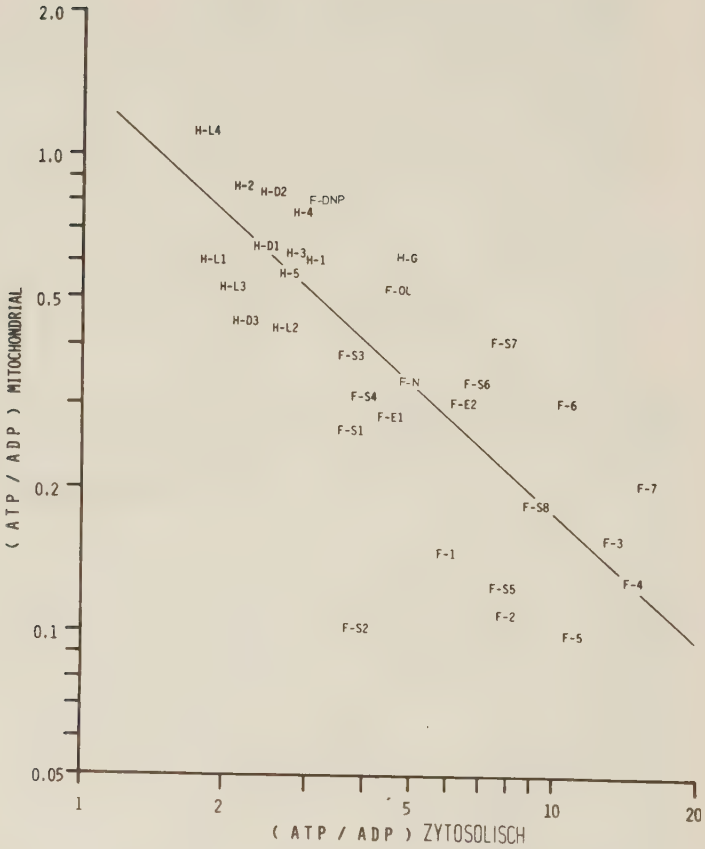


Abb. 15 : Reziproke Beziehung zwischen mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten.
Modifiziert nach(Soboll et al.,1978),Symbole mit Zahlen bedeuten Einzelexperimente, Symbole ohne Zahlen Mittelwerte aus 4-6 Einzelexperimenten.

Die subzelluläre Verteilung der Adeninnukleotide sollte daher vom Membranpotential abhängig sein. Tatsächlich besteht an isolierten Mitochondrien eine lineare Beziehung zwischen der Verteilung von Rubidium und dem Logarithmus des Quotienten der zytosolischen und mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten (Klingenberg & Rottenberg, 1977, Abb. 16).

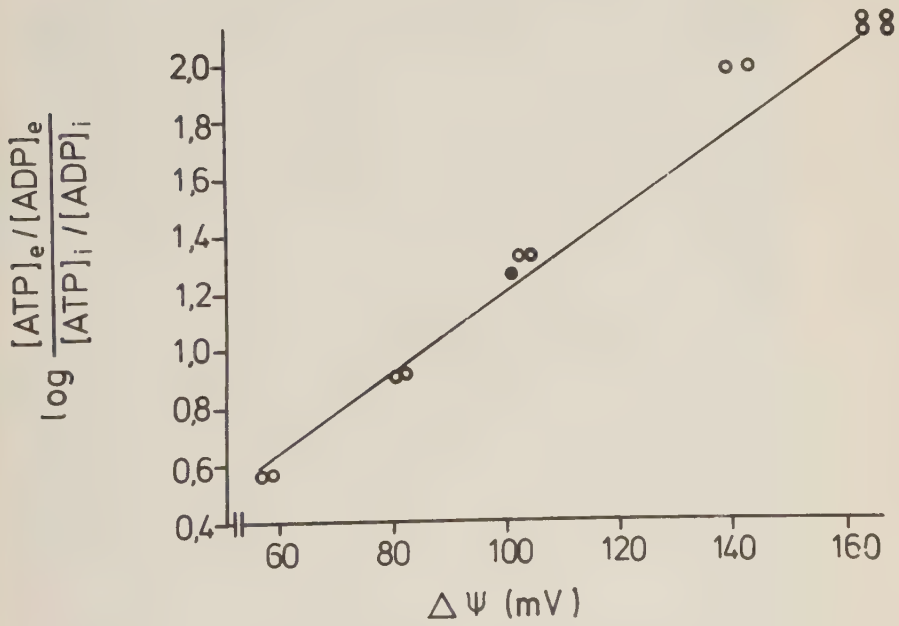


Abb. 16: Lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Verhältnisses der mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten und dem Membranpotential über die innere Mitochondrienmembran in isolierten Mitochondrien. (aus Klingenberg & Rottenberg, 1977)

Die Berechnung des Membranpotentials über die Mitochondrienmembran aus den subzellulären ATP/ADP-Quotienten sollte auch in der intakten Zelle möglich sein, sofern eine Äquilibrierung der mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten mit dem Membranpotential durch den Translokator angenommen werden kann. Nach Abb. 14 ist das unter metabolischen Bedingungen zu erwarten, wo sich eine sinnvolle Korrelation zwischen dem Verhältnis mitochondrialer und zytosolischer ATP/ADP-Quotienten und der Atmungsaktivität ergibt. Diese Korrelation besagt, daß die Verteilung der Adeninnukleotide den energetischen Zustand der Zelle widerspiegelt. Eine Kommunikation zwischen Atmungskette und Adeninnukleotidsystem erfolgt über die Protonmotive Force, welche die treibende Kraft der mitochondrialen ATP-Synthese ist. Einen großen Teil der Protonmotive Force repräsentiert wiederum das Membranpotential (siehe Tabelle 1, Hoek et al., 1980), so daß man annehmen kann, daß das Membranpotential die Verbindung zwischen Atmungskette und Adeninnukleotidsystem darstellt. Umgekehrt wird durch eine Änderung der subzellulären ATP- und ADP-Konzentrationen das Membranpotential und damit die Protonmotive Force beeinflußt. In Tabelle 19 ist aus der Verteilung der Adeninnukleotide das Membranpotential für verschiedene Stoffwechselzustände berechnet worden. Zum Vergleich sei auf die Werte in isolierten Mitochondrien (Tabelle 1) und isolierten Hepatozyten (Tabelle 19) hingewiesen; hier wurde das Membranpotential aus der Verteilung von Rubidium, Kalium oder dem lipophilen Kation Triphenylmethylphosphonium ($TPMP^+$), berechnet.

Tabelle 19: Δ pH, Protonenpotential ($\Delta\mu H^+$) und Membranpotential ($\Delta\psi$) über die innere Mitochondrienmembran in der intakten Leberzelle.

Berechnung des Membranpotentials aus mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten (Tabelle 9) nach Klingenberg & Rottenberg (1977).

$= 2.3 \frac{RT}{F} \lg \frac{ATP/ADP_{mit.}}{ATP/ADP_{zyt.}}$. Das Protonenpotential wurde wie in Tabelle 1 berechnet.

		$\Delta pH_{mit.-zyt.}$	$\Delta\mu H^+$ (mV)	$\Delta\psi$
F	gefüttert; --	0.30	- 18	- 107
FE	gefüttert; Äthanol	0.23	- 14	- 78
FN	gefüttert; NH_4Cl	0.57	- 35	- 73
FOl	gefüttert; Oleat	- 0.15	9	- 56
FDNP	gefüttert; DNP	- 0.43	26	- 34
isolierte Hepatozyten		0.97	- 60	- 161

Die Werte für perfundierte Leber sind niedriger als die Werte, die aus der Verteilung der Kationen erhalten wurden. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Adeninnukleotidtranslokator zu etwa 25 % elektro-

neutral, durch Protonen kompensiert, erfolgt (Klingenberg,1975). Demnach wären die aus der subzellulären Verteilung von ATP und ADP berechneten Werte eine Unterschätzung des Membranpotentials und können daher nur als Indikator für Bewegungen dem Membranpotentials gelten.

4.3.1 pH-Gradient über die Mitochondrienmembran und seine Beziehung zur Protonmotive Force.

Nach der chemiosmotischen Hypothese ist die mitochondriale Elektronentransportkette eine Protonenpumpe, die sowohl einen pH-Gradienten als auch einen elektrischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran aufbaut. Es erhebt sich die Frage, welcher Anteil der Protonmotive Force als Konzentrationsgradient bestehen bleibt und welcher Anteil im extramitochondrialen Raum abgepuffert, lediglich als elektrischer Gradient in Erscheinung tritt. In isolierten Mitochondrien konnte gezeigt werden, daß der Protonengradient bis zur Hälfte der Protonmotive Force ausmachen kann (Tabelle 1). Bei einem pH-Gradienten von 0.7 pH-Einheiten und einem Membranpotential von - 130 mV (Tabelle 1) ist die Protonmotive Force $\Delta p = \Delta\psi - RT/F\,\Delta pH$ gleich -172 mV. Unter Anwendung der subzellulären ATP/ADP-Quotienten als Indikatoren für das Membranpotential und den subzellulären pH-Werten (Tabelle 13) kann man berechnen, daß in der perfundierten Leber im Futterzustand der ΔpH über die Mitochondrienmembran etwa 1/3 der Protonmotive Force ausmacht (Tabelle 19).

Im entkoppelten Zustand ist der Protonengradient umgekehrt und in dieser Richtung etwa genauso hoch wie das Membranpotential, so daß die Protonmotive Force nahe 0 ist. Dinitrophenol als Entkoppler bewirkt einen netto Protoneneinstrom in den Matrixraum, und damit geht die in der Atmungskette frei werdene Energie verloren. Bei Perfusion mit Oleat verhalten sich sowohl das Membranpotential als auch der Protonengradient in der Tendenz ähnlich wie im entkoppelten Zustand. Auf diese Effekte soll in Kapitel 4.4 eingegangen werden.

Der Protonengradient spiegelt nicht den energetischen Zustand der Zelle wider. Er ist z.B. im Futterzustand bei hoher mitochondrialer ATP-Syntheserate (F) am niedrigsten und bei Perfusion mit NH_4Cl (FN) am höchsten. Obwohl ein Protonengradient der primäre Energiespeicher der mitochondrialen Oxidationsreaktion in der Atmungskette ist, scheint der im stationären Zustand der Zelle beobachtete Protonengradient eher ein Resultat der Aktivität von Stoffwechselwegen und /oder der Pufferkapazität in beiden Kompartimenten zu sein.

4.3.2 Verteilung von Di- und Tricarbonsäuren nach dem pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran.

Während das Membranpotential über die Mitochondrienmembran die subzelluläre Verteilung von Verbindungen, die in elektrisch geladener Form durch die Membran gelangen, beeinflußt, z.B. den Transport von Adeninnukleotiden, beeinflußt der pH-Gradient die Verteilung von schwachen Säuren, d.h.

von Verbindungen, die die Membran nur in der protonierten Form, nicht aber in der dissoziierten Form permeieren können. Für Di- und Tricarbonsäuren existieren in der inneren Mitochondrienmembran Transportsysteme für die Anionen der Carbonsäuren (Abb. 17). Allein der Citrat-Malat-Carrier und der Phosphat-Hydroxyl-Carrier katalysieren einen durch Protonen kompensierten Transport. An den Phosphattransport sind jedoch der Malat-Phosphat- und der Malat-α-Ketoglutarattransport gekoppelt, da zunächst Phosphat in die Mitochondrien transportiert werden muß, bevor Malat im Austausch gegen Phosphat, und α-Ketoglutarat im Austausch gegen Malat in die Mitochondrien gelangen können (Abb. 17). Für Malat, α-Ketoglutarat und Citrat wäre demnach eine Verteilung nach dem ΔpH über die Mitochondrienmembran denkbar. Unklar ist es im Falle des Glutamat, das sowohl im Austausch gegen Hydroxylionen als auch durch den Glutamat-Aspartat Translocator transportiert werden kann (Abb. 17). Der Glutamat-Aspartat Translokator transportiert Aspartat^{1-} ins Zytosol im Austausch gegen zytosolisches Glutamat, das durch Assoziation eines Protons elektrisch neutral ist. Dadurch gelangt ähnlich wie beim Adeninnukleotidtransport eine netto negative Ladung ins Zytosol. Es sollte daher für die subzelluläre Verteilung des Aspartat das Membranpotential richtunggebend sein. Tatsächlich wurde ein Aspartatgradient mitochondrial/zytosolisch von 0.01, wie er bei einem Membranpotential von 120 mV zu erwarten wäre, in keinem untersuchten metabolischen Zustand in perfundierter Leber (Soboll, 1977),

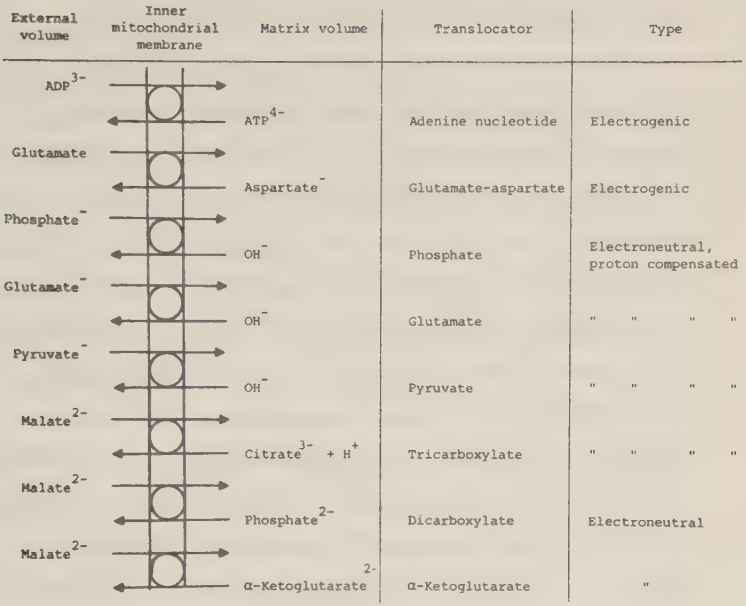


Abb. 17: Transportproteine in der inneren Mitochondrienmembran (aus Williamson, 1976)

oder isolierten Hepatozyten (Sies et al.; 1978, Tischler et al., 1977) gemessen. Dagegen verteilen sich in isolierten Mitochondrien (Mc Givan & Klingenberg, 1971; Palmieri et al., 1970) und isolierten Hepatozyten (Tischler et al., 1977; Siess et al., 1981) die Carbonsäuren Citrat, Malat und α-Ketoglutarat, nicht aber Glutamat, nach dem pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran. Die Untersuchungen an perfundierter Leber können diese Befunde nur teilweise bestätigen. Allein im Zustand F wurde eine Verteilung der Carbonsäuren Citrat, Malat und α-Ketoglutarat nach dem pH-Gradienten beobachtet (Tabellen 11 und 12). Aspartat und Glutamat verteilten sich in keinem Fall nach dem pH-Gradienten. Es sei darauf hingewiesen, daß isolierte Hepatozyten und perfundierte Leber bezüglich des Stoffwechselzustandes nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Zwar sind in Hepatozyten ähnliche Raten an Harnstoffsynthese, Glukoneogenese u. a. wie an perfundierter Leber gemessen worden (Krebs et al., 1974), jedoch sind Hepatozyten nach der Isolation zunächst an Metaboliten verarmt und synthetisieren diese während der ersten 60 min der Inkubation neu (Krebs et al., 1974; Soboll, 1977); Lebern, die im offenen System perfundiert werden, geben ständig Metabolite, besonders Aminosäuren und Carbonsäuren, an das Perfusat ab. Auslenkungen von Gleichgewichtseinstellungen sind daher in diesem System eher zu erwarten als bei isolierten Hepatozyten, sofern letztere eine ausreichend lange Zeit inkubiert werden. Die Frage ob, und in welchen Stoffwechselzuständen sich die Carbonsäuren nach dem pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran verteilen, bleibt daher noch

durch Experimente an Lebern, die in situ friergestoppt werden, zu überprüfen.

4.4 Störung des Energiestoffwechsels durch freie Fettsäuren.

Bei Infusion von Oleat zu Lebern gefütterter Ratten ist ein starker Anstieg des Sauerstoffverbrauches zu beobachten, der nicht durch eine Steigerung Energie verbrauchender Prozesse zu erklären ist und sich auch nicht in einer Erhöhung des ATP-Spiegels niederschlägt. Es sieht daher so aus, als ob in diesem Fall Energie von der Zelle verbraucht wird, die nicht in irgendeiner Form genutzt wird, ähnlich wie bei Entkopplung durch Dinitrophenol. Auch die Veränderungen des pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran (Tabellen 13 und 19)und der subzellulären ATP/ADP-Quotienten (Tabellen 9 und 19) gehen in dieselbe Richtung wie bei FDNP. So ist der pH-Gradient umgekehrt wie in Kontrollexperimenten und auch das Verhältnis der ATP/ADP-Quotienten zwischen Mitochondrien und Zytosol ist erniedrigt(Abb. 14), sodaß die Protonmotive Force vermutlich sehr klein ist. Ein entkoppelnder Effekt von freien Fettsäuren wurde erstmals an isolierten Mitochondrien beobachtet (Bode & Klingenberg, 1965; Borst et al., 1962; Lehninger et al., 1959),man glaubte, daß das im physiologischen Bereich wenig Bedeutung hätte und nur bei hohen Konzentrationen von freien Fettsäuren auftritt. Der größte Teil der freien Fettsäuren ist an Albumin gebunden. In eigenen Untersuchungen stellte sich

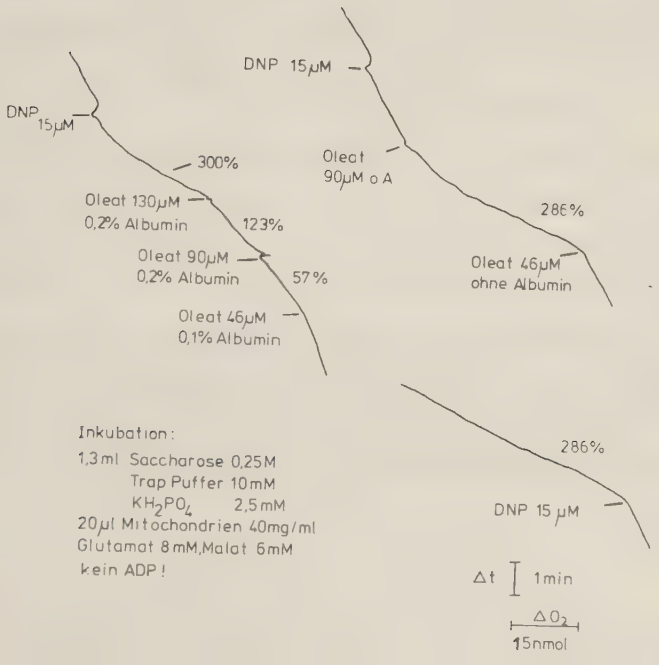
heraus, daß schon Oleatkonzentrationen von 50 µM isolierte Mitochondrien ebenso stark entkoppeln wie 30 uM Dinitrophenol (Abb. 18). Auch bei Zugabe derselben Menge Oleat mit 0.2 % Albumin war der Effekt beträchtlich. Ein Detergenseffekt der freien Fettsäure ist bei dieser Konzentration unwahrscheinlich.

Der Entkoppler DNP hat die Fähigkeit sowohl als Anion als auch als undissoziierte schwache Säure die innere Mitochondrienmembran permeieren zu können. Das Anion wird durch die negative Ladung des Matrixraumes in das Zytosol getrieben, während die undissoziierte Säure dem pH-Gradienten folgend in den Matrixraum strömt. Daraus resultiert ein Netto-Protonentransport, der der Richtung der von der Elektronentransport getriebenen Protonenpumpe entgegengerichtet ist und daher die Protonmotive Force verkleinert. Als Folge davon sieht man einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches und eine Verkleinerung des pH-Gradienten und des Membranpotentials über die Mitochondrienmembran. Auch bei Perfusion hoher Konzentrationen von Azetat sieht man einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches der Leber (Tabelle 20). Die Konzentrationen liegen jedoch um zwei Größenordnungen höher, und eine Veränderung des pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran ist nicht zu beobachten ($\Delta pH = 0.39$). Veränderungen des pH-Gradienten durch Azetat, die zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauches führen, sind durch die hohen Konzentrationen an Azetat zu erklären, die eingesetzt wurden, so daß, wenn überhaupt eine protonophore Wirkung vorliegt, sie durch

Tabelle 20: Anstieg des Sauerstoffverbrauches in perfundierter Leber nach Infusion verschiedener Carbonsäuren.

		Sauerstoffverbrauch µmol/g x h vorher	nachher	O_2 %
Gefüttert; Azetat	10 mM	150	190	24
Gefüttert; Oleat	0.3 mM	158	203	29
Albumin	0.5 %			
Gefüttert; DNP	0.03 mM	139	255	83

Abb. 18: Wirkung von freier und gebundener Ölsäure auf isolierte Mitochondrien. Zum Vergleich der Effekt von Dinitrophenol (DNP).



die Protonenpumpe der Elektronentransportkette kompensiert wird. Oleat jedoch ruft dieselben Veränderungen am pH-Gradienten und am Adeninnukleotidsystem hervor wie DNP, wobei Fettsäure, die oxidiert wird, nicht für die entkoppelnde Wirkung verantwortlich ist. Bei Hemmung der Acylcarnitintransferase ist der Anstieg des Sauerstoffverbrauches bei Oleatinfusion ebenfalls zu beobachten, owohl die $^{14}CO_2$-Produktion aus 1-^{14}C-Oleat gehemmt ist (Abb. 19).

Permeabilitätsstudien mit 1-^{14}C-Oleat zeigten ferner, daß isolierte Mitochondrien Oleat in weniger als 15 s etwa 6-fach anreichern. Es ist jedoch unklar, ob freie Ölsäure als Protonophor wirkt, d. h. in den Matrixraum gelangt, oder ob es nur eine Veränderung der Mitochondrienmembran und so eine Erhöhung der Permeabilität für Protonen bewirkt. Die Veränderung des pH-Gradienten, die in perfundierter Leber bei Infusion von Oleat gemessen wurde, dürfte ungeachtet der Frage, wie sie zustande kommt, die Ursache des entkoppelnden Effektes freier Fettsäuren wie Oleat sein.

Auch in anderen Zellen bewirken freie Fettsäuren eine Störung des Energiestoffwechsels, erkennbar an einer Verminderung des zellulären ATP-Spiegels. An Lymphozyten verursachten cis-ungesättigte Fettsäuren eine Verarmung an zellulärem ATP (Corps et al., 1980). Bei isoliert perfundierten Herzen wird bei Infusion mit 1 mM Octanoat, einer in der experimentellen Herzphysiologie häufig verwendeten Fettsäure, ein gegenüber dem Kontrollexperiment erhöhter

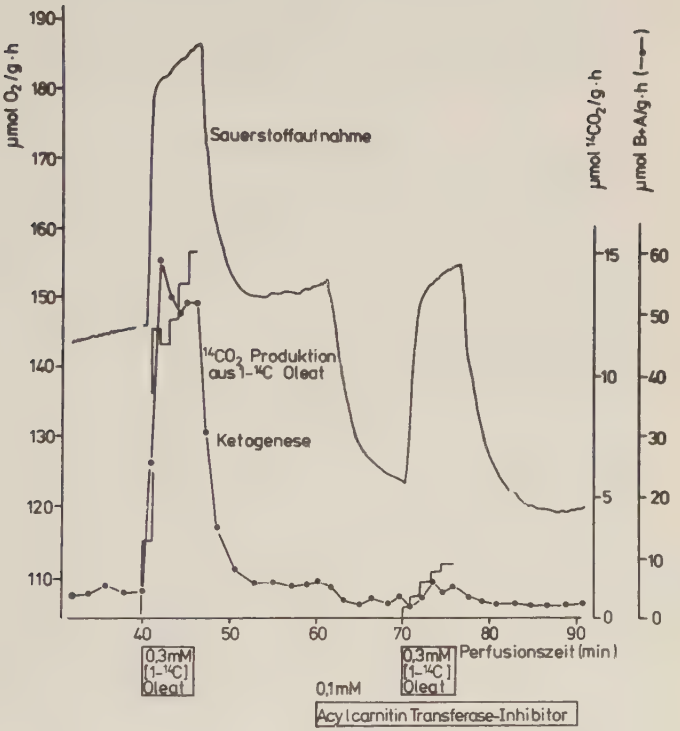


Abb. 19: Sauerstoffverbrauch, Fettsäureoxidation und Ketogenese in perfundierter Leber nach Infusion von 0.3 mM Oleat mit und ohne 0.1 mM Acylcarnitin-transferaseinhibitor POCA (Phenyl-oxiran-carbonsäure).

Sauerstoffverbrauch bei gleicher Arbeitsleistung und erniedrigter Differenz der mitochondrialen und zytosolischen Phosphorylierungspotentiale (Soboll & Bünger, 1980b) beobachtet. Es erhebt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser an isolierten Systemen beobachteten Veränderung des Energiestoffwechsels durch freie Fettsäuren. Beim Herzen in vivo dürfte die oxidative Kapazität groß genug sein, um die freien Fettsäuren vollkommen zu oxidieren. Etwas anders ist es in der Leber. Ihre oxidative Kapazität ist geringer.Bei einer Störung der Reveresterung freier Fettsäuren, z.B. im Diabetes kann es zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut und in der Leberzelle kommen (Löffler, 1971).Auch bei Einnahme einer fettreichen Mahlzeit gelangen kurzkettige Fettsäuren und Fettsäuren mittlerer Kettenlänge durch die Pfortader direkt in die Leber (Bloch & Haberich, 1973) und können so zu einer kurzfristigen Erhöhung freier Fettsäuren in der Leberzelle führen.In solchen Fällen ist es vorstellbar, daß Fettsäuren nicht quantitativ der Produktion von ATP dienen. Dennoch müssen die bei der Oxidation anfallenden Reduktionsäquivalente (bei FOl ist sowohl der Laktat/Pyruvat- als auch der Hydroxybutyrat/Azetoazetat-Quotient erhöht) aus der Leberzelle entfernt werden, um eine Störung des mitochondrialen und zytosolischen NAD-Systems zu verhindern. Es wäre in diesem Fall sinnvoll, einen Teil der Oxidationsreaktion in der Elektronentransportkette von der Synthese von ATP zu entkoppeln.Der entkoppelnde Effekt ist nicht in sochem Ausmaße zu erwarten wie im Modellversuch an der perfundierten Leber, da die Konzentration an freien Fettsäuren in der Leberzelle sicher noch niedriger ist.

Es sei erwähnt, daß an isolierten Hepatozyten der Effekt von Oleat auf den Sauerstoffverbrauch zwar beobachtet werden kann, nicht jedoch ein Absinken des ATP/ADP-Quotienten in der Zelle (Siess et al., 1978; Akerboom et al., 1980).

4.5 Subzelluläre Phosphorylierungspotentiale des ATP

Die treibende Kraft einer Reaktion ist ihre potentielle Energie oder das Potential. Die mitochondrialen und zytosolischen Phosphorylierungspotentiale des ATP können endergone Prozesse antreiben und exergone Prozesse regulieren. In den vorangegangenen Kapiteln war nur von den subzellulären ATP/ADP-Quotienten die Rede. Die subzellulären Konzentrationen des Phosphat sind hoch und der Phosphatcarrier in der inneren Mitochondrienmembran hat eine weitaus höhere Transportgeschwindigkeit als der Adeninnukleotidtranslokator (La Noue & Schoolwerth, 1979), eine kinetische Kontrolle des Phosphattransportes ist daher unwahrscheinlich. Es ist eher anzunehmen, daß die subzellulären Phosphatkonzentrationen das Resultat von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen sind und, was das Phosphorylierungspotential des ATP betrifft, mit zur Einstellung optimaler subzellulärer Phosphorylierungspotentiale beitragen sollen. Z.B. in isolierten Hepatozyten ist die Differenz der mitochondrialen und zytosolischen Phosphorylierungspotentiale ähnlich wie in perfundierter Leber (Tabellen 21,22) obwohl die mitochondrialen

Tabelle 21 : Subzelluläre Phosphorylierungspotentiale des ATP in perfundierter Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen.

Die Phosphorylierungspotentiale (Konzentrationsterm der Nernst'schen Gleichung) wurden aus den Mittelwerten in den Tabellen 9 und 10 berechnet.

Expt.	Bedingungen	$-RT \ln \frac{[ADP] \times [P]}{[ATP]}$		Potentialdifferenz $\Delta G_{mit.-zyt.}$
		Mitochondrien	Zytosol	
		kJ x mol^{-1}		
F	gefüttert; -	- 7.5	- 18.3	10.8
FS	gefüttert; Glukose etc.	- 8.6	- 16.5	7.9
FE	Gefüttert; Äthanol	- 9.0	- 16.4	7.4
FOl	gefüttert; Oleat	- 10.7	- 15.8	5.1
FN	gefüttert; NH_4Cl	- 9.2	- 16.0	6.8
FCat	gefüttert; Carboxyatraktylosid	- 13.1	- 16.2	3.1
FDNP	gefüttert; DNP	- 11.7	- 15.0	3.3
FAm	gefüttert; Amytal	- 10.3	- 16.5	6.2
H	gehungert; -	- 11.2	- 14.6	3.4
HL	gehungert; Laktat	- 11.1	- 14.0	2.9
HD	gehungert; Dihydroxyaceton	- 11.0	- 14.3	3.3
HG	gehungert; Glukose	- 10.9	- 16.1	5.2

Legende zu Tabelle 22:

1 nicht-wässrige Fraktionsmethode
2 Digitonin-Methode
3 Berechnet aus den zytosolischen Gehalten von Kreatin und Kreatinphosphat und der Massenwirkungskonstante der Kreatinkinasereaktion $K = 2.04 \times 10^{9}$ (Altschuld & Brierley, 1977) , zytosolischer pH-Wert von 7.05 (Steenbergen et al., 1978).

Tabelle 22: Kompartimentierung der Adeninnukleotide in verschiedenen Geweben und isolierten Zellen. (Legende auf Seite 96)

	Mitochondrien		Zytosol			
	ATP/ADP	RT ln $\frac{[ADP] \times [P]}{[ATP]}$ [kJ/mol]	ATP/ADP	RT ln $\frac{[ADP] \times [P]}{[ATP]}$ [kJ/mol]	$\Delta G_{mit.-zyt.}$ [kJ/mol]	Referenzen
Perfundierte Rattenleber [1]						
Gefüttert	0.18	- 7.5	10.3	-18.3	10.8	Soboll et al., 1978
Gehungert	0.67	-11.2	2.6	-14.4	3.2	"
Rattenleber in vivo [1]						
Gefüttert	0.92		6.9			Schwenke et al., 1981
Gehungert	1.04		5.9			"
Isolierte Leberzellen [2]						
	1.8	-12.0	8.8	-20.3	8.3	Akerboom et al.,1978
	2.0		6.0			Siess & Wieland,1976
	2.1 [1]		6.6 [1]			Soboll et al., 1980 [a]
Perfundiertes Meerschweinchenherz [1]						
Kontrolle	3.3	-16.4	122 [3]	-24.1	7.7	Soboll & Bünger, 1981
Noradrenalin	4.3	-17.6	60 [3]	-21.8	4.2	"
Perfundiertes Rattenherz [1]						
nicht schlagend	1.0	-12.9	74 [3]	-26.0	13.1	Kauppinen et al.,1980
schlagend	2.7	-16.3	40 [3]	-24.8	7.7	"
Rattenherzfibroblasten [1]	2.3	-18.5	105 [3]	-28.0	9.5	Soboll et al., 1979

ATP/ADP-Quotienten in perfundierter Leber etwa 10-fach niedriger sind als in Hepatozyten. Es werden in isolierten Hepatozyten etwa 5-fach höhere mitochondriale Phosphatkonzentrationen gemessen als zytosolische (Akerboom et al., 1978), während in perfundierter Leber kein Konzentrationsgradient zwischen beiden Kompartimenten für Phosphat gefunden wurde (Tabelle 10), dadurch ist die Differenz zwischen mitochondrialem und zytosolischem Phosphorylierungspotential trotz großer Unterschiede im mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten in perfundierter Leber und isolierten Hepatozyten sehr ähnlich.
Interessanterweise ist die Differenz der Phosphorylierungspotentiale auch im Herzen und in kultivierten Rattenherzfibroblasten ähnlich wie in Leber oder Leberzellen, obwohl die subzellulären ATP/ADP-Quotienten im Herzen viel höher sind als in der Leber (Tabelle 22). Dieser Unterschied zwischen mitochondrialen und zytosolischen Phosphorylierungspotentialen gibt den Energiebetrag wieder, der für den ATP-Export benötigt wird und ermöglicht offensichtlich ein effizientes Funktionieren energieabhängiger mitochondrialer und zytosolischer Stoffwechselvorgänge.

4.6 Regulation der Atmung; thermodynamische Atmungskontrolle

Die thermodynamische Beschreibung der Atmungskontrolle erlaubt es, ohne Wissen des detaillierten Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung (Eigenschaften des Adeninnukleotidtranslokators, chemiosmotische Hypothese, Wechselbeziehung zwischen mitochondrialen und zytosolischen

ATP/ADP-Quotienten, Rolle des Δ pH über die Mitochondrienmembran) Vorhersagen über das Verhalten der Atmungskette zu machen, da die Kontrolle der mitochondrialen Atmung letztlich eine thermodynamische Kontrolle ist. Abb. 20 zeigt die schematische Darstellung der Mitochondrien als Energiewandler (aus Stucki, 1980). Der Energiewandler (converter) besteht aus der Protonenpumpe der mitochondrialen Atmungskette der mitochondrialen ATP-Synthase und dem Adeninnukleotidtranslokator, der die Verbindung zwischen dem mitochondrialen und extramitochondrialen Raum herstellt. Die Input Power $X_o \times J_o$ ist an die Output Power $X_p \times J_p$ durch einen Mechanismus gekoppelt, für den keine Annahmen gemacht werden brauchen, ein Maß für den Grad der Kopplung ist der Kopplungsfaktor q. Die Input Power setzt sich aus dem Redoxpotential (NADH $\longrightarrow O_2$), X_o und dem Fluß durch die Elektronentransportkette, J_o, zusammen. Die Output Power ist das Produkt aus X_p, dem zytosolischen Phosphorylierungspotential und J_p, der Geschwindigkeit der netto ATP-Synthese. J_p ist die Differenz aus ATP-Synthese und ATP-Hydrolyse, die in Abb. 20 als Load L_p bezeichnet ist. Die theoretische Abhandlung dieser Vorgänge ist anhand von verschiedenen Modellen versucht worden, von denen drei Beispiele vorgestellt werden. Durch Einsetzen der gemessenen Werte für J_o, X_o und X_p (oder Parametern,die diese Werte repräsentieren) aus Experimenten mit perfundierter Leber wird versucht im Folgenden festzustellen, ob diese Modelle eine realistische Beschreibung der Verhältnisse in der intakten Leber darstellen.

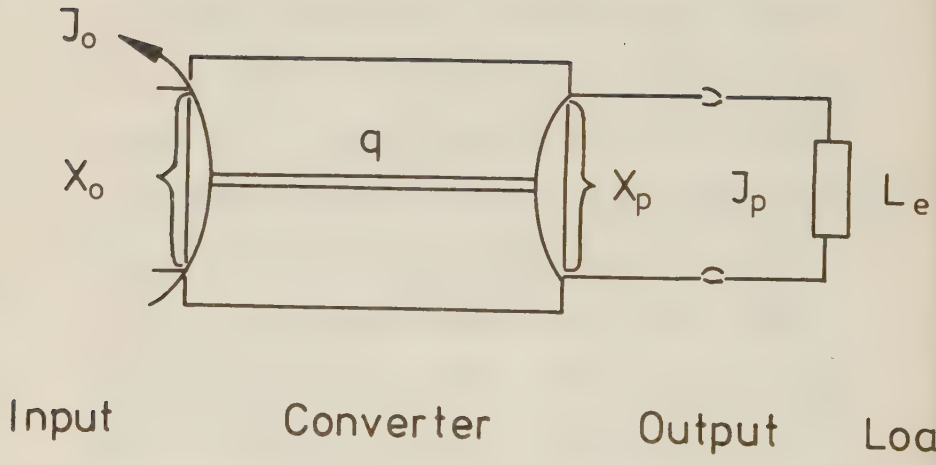


Abb. 20: Thermodynamisches Modell der oxidativen Phosphorylierung. Die Mitochondrien als Energiewandler (converter). Input = $X_o \times J_o$ (zytosolisches Redoxpotential x Geschwindigkeit der Elektronentransportkette); q = Kopplungsfaktor zwischen Oxidation und Phosphorylierung. Output = $X_p \times J_p$ (zytosolisches Phosphorylierungspotential x Geschwindigkeit der ATP-Synthese), Load = Geschwindigkeit des zytosolischen Verbrauchs (aus Stucki, 1980).

Modell (1): Erecinska & Wilson (1978) gehen von der Annahme aus, daß die Summe der Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung im Gleichgewicht oder nahe dem Gleichgewicht ist. Zu dieser Annahme führt die Beobachtung einer linearen Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Protonmotive Force (Azzone et al., 1971; Mitchell & Moyle, 1967; Nicholls, 1974; Padan & Rottenberg, 1973) bzw. zytosolischen ATP/ADP-Quotienten (Davis & Lumeng, 1975; Küster & Bohnensack, 1976). Es wurde ein dreidimensionales Nomogramm entwickelt, in dem der mitochondriale NADH/NAD-Quotient, Cytochrom c turnover(vergleichbar J_O) und das zytosolische Phosphorylierungspotential (X_p) die drei Dimensionen darstellen. Das mathematische Modell geht davon aus, daß die Atmungsgeschwindigkeit in den Mitochondrien als eine Funktion der drei Parameter beschrieben werden kann, und die Graphik ist so angelegt, daß bei experimenteller Verifizierung des Modells die drei Auftragungspunkte in einem einzigen Punkt zusammenfallen müssen (Abb. 21).

Eine lineare Beziehung zwischen Atmungsrate und Protonmotive Force bzw. zytosolischem ATP/ADP-Quotienten muß nicht unbedingt Gleichgewicht bedeuten. Vielmehr kann es auch weitab vom Gleichgewicht lineare Bereiche geben (Rottenberg, 1979). Im Gleichgewichtszustand wäre der netto Fluß der ATP-Synthese gleich Null, ein Zustand, der in vivo nicht erreicht werden kann. Ferner konnte in perfundierter Leber gezeigt werden, daß diese lineare Beziehung im Hungerzustand nicht mehr besteht (Abb. 14), wahrscheinlich durch eine Hemmung der Adeninnukleotidtranslokation. Erwartungs-

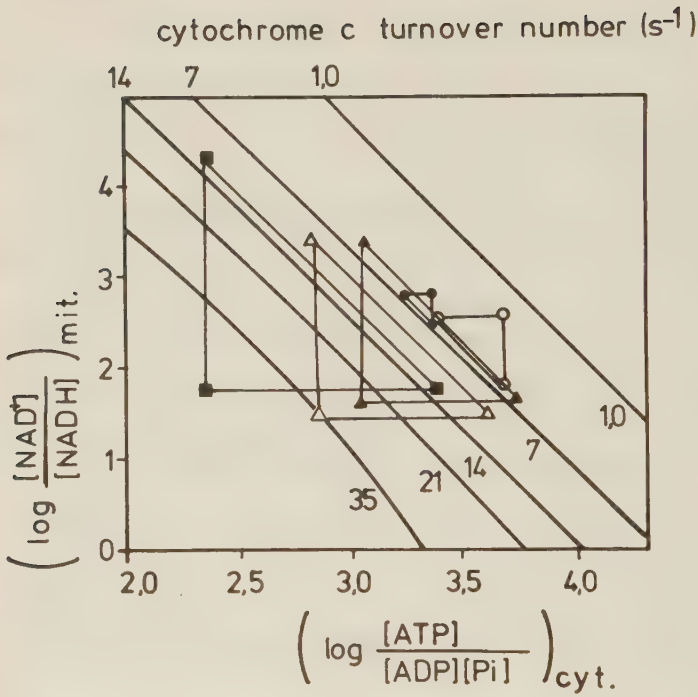


Abb. 21: Graphisches Modell der Beziehung zwischen mitochondrialem NAD^+/ NAD-Quotienten, zytosolischem Phosphorylierungspotential und Geschwindigkeit der Elektronentransportkette, ausgedrückt als Cytochrom c Turnover (Holian et al., 1977);

● Hepatocyten (Erecinska et al., 1977), ◭ (Erecinska & Wilson, 1978); O Nierenzellen (Erecinska & Wilson, 1978); △ perfundierte Rattenleber, gefüttert, □ gehungert (Soboll et al., 1978).

gemäß waren bei Eintragung eigener Werte und der Werte aus Experimenten anderer Autoren in das Nomogramm Abweichungen von über einer Größenordnung festzustellen, die die Glaubwürdigkeit des Modells in Frage stellen.

Modell (2) (van der Meer et al., 1978) geht von der Tatsache aus, daß nicht nur chemische Reaktionen, die nahe am Gleichgewicht ablaufen, linear verlaufen können, sondern auch solche, die weit vom Gleichgewicht entfernt sind, aber im Bereich der Km-Werte für ihre Substrate. Er beschreibt die Reaktion der oxidativen Phosphorylierung nach den Gesetzen der irreversiblen Thermodynamik. Bei seinem Modell kommt er zu einer linearen Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und chemischer Affinität (siehe Abb. 22). Eine lineare Beziehung wird experimentell durch Versuche an isolierten Hepatozyten verifiziert (Abb. 22). Bei Eintragung von Werten aus Experimenten mit perfundierter Leber läßt sich ebenfalls eine lineare Beziehung feststellen. Die Steigung der Geraden ist geringer als im Hepatozytenexperiment; dort ist wahrscheinlich die Geschwindigkeit des Elektronentransportes anders als in perfundierter Leber (siehe 4.7).
Das Modell bestätigt eine lineare Beziehung zwischen Atmung und Phosphorylierungspotential. Ferner läßt sich das Verfahren der irreversiblen Thermodynamik besser mit der irreversiblen Reaktion der terminalen Cytochrom c Oxidase der mitochondrialen Elektronentransportkette vereinbaren. Es sagt jedoch nichts über die Effizienz der oxidativen Phos-

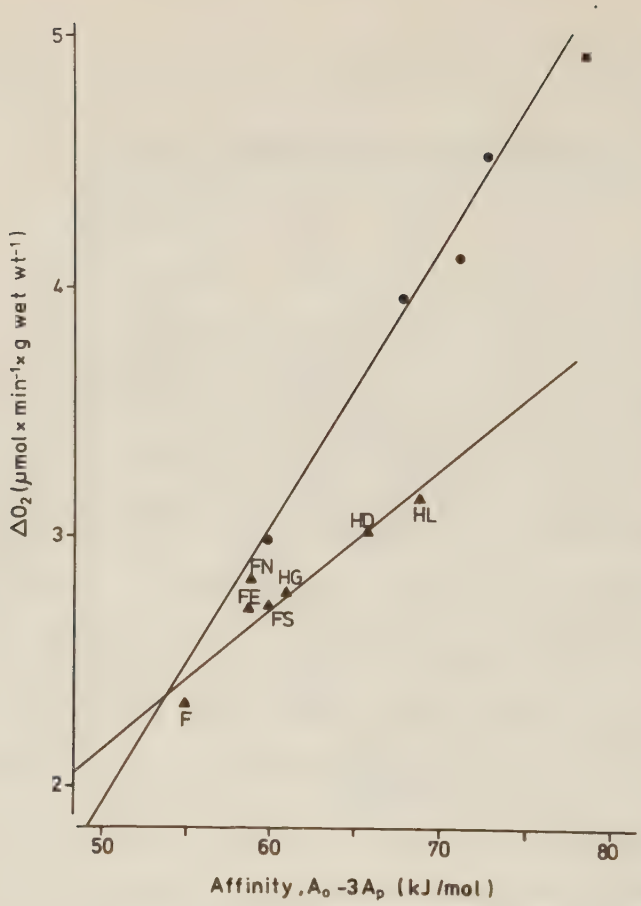


Abb. 22: Lineare Beziehung zwischen der Aktivität der Atmungskette (Sauerstoffverbrauch) und der "Chemischen Aktivität" ($A_o - 3\ A_p$, van der Meer et al., 1978) in isolierten Hepatozyten (●) und perfundierter Leber (▲).

$A_o = 217.4 + 5.93 \lg (NADH/NAD_{mit.} \times [O_2])$ kJ/mol

$A_p = 29.3 + 5.93 \lg \left([ATP] / [ADP] \times [P] \right)_{zyt.}$ kJ/mol

Symbole für die Werte aus perfundierter Leber siehe Tabelle 6, die Werte zur Auftragung wurden aus den Tabellen 7 und 9 berechnet.

phorylierung, der wichtigsten Reaktion der zellulären Energiegewinnung aus. Das Modell nimmt an, daß Oxidation und Phosphorylierung voll gekoppelt sind. Dies ist nicht realistisch, was die Tatsache einer State 4 Atmung (Atmung ohne ADP) in isolierten Mitochondrien beweist. Modell (3): Ein drittes Modell (Stucki, 1980) beschreibt die oxidative Phosphorylierung ebenfalls nach den Gesetzen der irreversiblen Thermodynamik und nimmt eine lineare Beziehung zwischen Fluß J_o (J_p) und Potential X_o (X_p) an. Stucki verzichtet ganz auf mechanistische Vorstellungen, wie sie der Annahme eines Kopplungsfaktors von 1 zugrunde liegen und zeigt, daß der Kopplungsfaktor in vivo kleiner als 1 sein muß, da bei einer vollen Kopplung nicht maximale Effizienz der oxidativen Phosphorylierung erreicht wird (je höher X_p, desto mehr Kraft muß aufgewendet werden, um ATP zu synthetisieren). Für die in perfundierter Leber gemessenen stationären Konzentrationen von ATP, ADP und AMP (Tabelle 9) wurde ein Kopplungskoeffizient von 0.97 im Futterzustand und 0.95 im Hungerzustand (Stucki, 1980) berechnet, das sind Werte für q, die nahe dem Wert für maximale Output Power bei maximaler Effizienz und maximalem Fluß J_p, der ATP-Synthese liegen (Stucki, 1980). In anderen Worten: In der Zelle wird ein Wert für q eingestellt, der entweder eine möglichst hohe ATP-Synthesegeschwindigkeit oder die Einstellung eines möglichst hohen Phosphorylierungspotentials erlaubt. Das Modell erlaubt eine detailliertere Beschreibung der Vorgänge bei der Energiekonversion in der oxidativen Phosphorylierung, besonders der Effizienz der Energiekonversion bei unterschiedlichen Funktionen der Zelle.

4.7 Unterschiede im subzellulären Energiestoffwechsel zwischen isolierten Hepatozyten, perfundierter Leber und Leber in vivo.

Im Prinzip sollte die Anwendung der verschiedenen Methoden zur Fraktionierung der Zelle, z.B. die nicht-wässrige Fraktionsmethode und die Digitonin-Methode, zu ähnlichen Werten für die subzellulären Metabolitkonzentrationen in isolierten Hepatozyten und intakter Leber kommen, sofern es gelingt, in beiden Systemen vergleichbare Stoffwechselbedingungen einzustellen. Es wurden in vielen Fällen ähnliche Resultate erzielt (Siess et al., 1981). Anfängliche Zweifel an der Zuverlässigkeit der beiden Methoden konnten zumindest für Untersuchungen am Adeninnukleotidsystem ausgeräumt werden. So zeigte eine vergleichende Untersuchung, in der isolierte Hepatozyten nach beiden Methoden fraktioniert wurden, daß man mit beiden Methoden dieselben Ergebnisse erzielte (Tab. 14) Diese Messungen sind einerseits eine wechselseitige Bestätigung beider Methoden, andererseits beweisen sie, daß die in Hepatozyten gefundenen hohen mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten ihre Ursache in einem Unterschied der beiden experimentellen Systeme haben. In Untersuchungen an der Leber in vivo war der mitochondriale ATP/ADP-Quotient etwa bei 1.0, also deutlich höher als in perfundierter Leber, aber niedriger als in isolierten Hepatozyten. Was konnte diesen Unterschied in beiden extremen Systemen, perfundierte Leber und isolierte Hepatozyten bewirken? Ein Hinweis darauf könnte sein, daß in isolierten Mitochondrien (Davis et al, 1980; Küster et al, 1976) und auch in isolierten

Hepatozyten (Akerboom et al., 1977) Untersuchungen auf eine Limitierung des Adeninnukleotidtransportes gegenüber der Geschwindigkeit der mitochondrialen ATP-Synthese hindeuten, während in perfundierter Leber die Translokation nicht limitiert (4.2.2). Intakte Leber könnte überschüssige Transportkapazität haben, wenn die mitochondriale ATP-Synthese verlangsamt wäre. Dies könnte z.B. durch schlechtere Sauerstoffzufuhr der Zelle im intakten Organ bewirkt werden. Es ist bekannt, daß in der Leber große Sauerstoffkonzentrationsgradienten bestehen (Sies, 1977; Lübbers, 1968; Matschinski et al., 1978). Zwar ist der Km-Wert der Atmungskette für Sauerstoff gering ($\sim$1 µM), die Beziehung zwischen Phosphorylierung und Sauerstoffangebot ist jedoch nicht genau untersucht. Wilson (Wilson et al., 1979) argumentierte, daß die mitochondriale ATP-Synthese in vivo durch Sauerstoff limitiert sein könnte, auch wenn keine Reduktion der Atmungskettenkomponenten beobachtet wird, indem bei erniedrigtem ATP/ADP-Quotienten das Phosphorylierungspotential durch kompensatorischen Anstieg des Phosphat konstant gehalten wird. Außerdem ist die treibende Kraft der Atmungskette die Protonmotive Force, welche über das Membranpotential mit den zytosolischen und mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten in Verbindung steht. Das Verhältnis zwischen mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten (und damit das Membranpotential) kann auch hoch sein, wenn der mitochondriale ATP/ADP-Quotient infolge inhibierter mitochondrialer ATP-Synthese niedrig ist und der zytosolische ATP/ADP-Quotient infolge hoher ATP-Exportgeschwindigkeit hoch ist und durch die ATP-Synthese in der Glykolyse zusätzlich erhöht wird (Zustand F).

Ist es vorstellbar, daß die Leber in vivo an Sauerstoff limitiert ist? Sie ist vermutlich gleichmäßiger mit Sauerstoff versorgt als das perfundierte Organ, da Krebs-Henseleit-Puffer eine schlechtere Kapazität für Sauerstoff hat als Blut. Ein Hinweis für eine bessere Versorgung mit Sauerstoff könnten die 3 - 4fach höheren mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten in der Leber in vivo (Tabelle 15) sein. Perivenöse Bereiche des Organs können unter Umständen nicht von einer ausreichenden Menge Sauerstoff erreicht werden, auch wenn das Perfusat mit Sauerstoff gesättigt ist. In Experimenten, in denen die Sauerstoffkonzentration des Perfusates durch Zugabe von H_2O_2 erhöht wurde, konnte der mitochondriale ATP/ADP-Quotient der perfundierten Leber auf etwa 1.0 erhöht werden. Diese Untersuchungen sind noch im Gange.

Es ist vorstellbar, daß die Leber auch bei limitierender Sauerstoffkonzentration in bestimmten Bereichen des Gewebes ausreichend mit ATP versorgt ist. Sie braucht z.B. nicht soviel ATP wie ein Herzmuskel, der bei der Kontraktion große Mengen ATP hydrolysiert. Daher benötigt die Leber nicht das Kreatinsystem als zusätzliches Puffersystem für das ATP-System. Glykolyse und Adenylatkinasereaktion reichen aus, um den zytosolischen ATP/ADP-Quotienten hoch zu halten. Biosynthetische Prozesse, wie z.B. die Glukoneogenese können noch bei einem so niedrigen ATP/ADP-Quotienten von 2.2 (HL, Tabelle 9) mit hoher Geschwindigkeit ablaufen. Ferner haben nach neueren Untersuchungen die perivenösen Zellen andere metabolische Aufgaben als die periportalen Zellen (Jungermann, 1981); sie haben mehr glykolytische Aktivität, während in den periportalen Regionen be-

vorzugt Glukoneogenese stattfindet.

Die Untersuchung des Energiestoffwechsels in Zellkompartimenten führt somit schließlich zur funktionellen Kompartimentierung ursprünglich gleicher Zellen im Zellverband, die z.B. durch unterschiedliche Oxygenierung hervorgerufen wird. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die perivenösen und periportalen Hepatozyten auch in der Enzymausstattung und der Bevorzugung anderer Stoffwechselwege unterscheiden (Jungermann, 1981).

5. Zusammenfassung

Der Energiestoffwechsel der Zelle ist kompartimentiert. Die Mitochondrien dienen vorwiegend der ATP-Synthese, während im Zytosol ATP verbrauchende Reaktionen, wie Biosynthesen oder mechanische Arbeit die größere Rolle spielen. Die Regulation der wichtigsten Stoffwechselwege, in denen ATP gebildet wird, Glykolyse und Atmungskette, sowie die Regulation des Austausches der Adeninnukleotide zwischen Mitochondrien und Zytosol ist für die Funktion der Zelle von grundlegender Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Regulation des Energiestoffwechsels in Mitochondrien und Zytosol in der intakten Zelle zu untersuchen. Es wurden mitochondriale und zytosolische Gehalte von ATP, ADP, AMP, Phosphat, Kreatinphosphat und Kreatin in Herz und Leber nach Fraktionierung des Gewebes in nicht-wässrigen Medien bestimmt und die subzellulären Konzentrationen berechnet.Ferner wurden subzelluläre pH-Werte und Gehalte von Di- und Tricarbonsäuren bestimmt und die Konzentrationsgradienten mitochondrial/zytosolisch berechnet. Als Untersuchungsmodelle dienten isoliert perfundierte Organe oder isolierte Zellen - hier wurde auch die Geschwindigkeit von Stoffwechselflüssen wie Glykolyse-, Glukoneogenese- oder Atmungsaktivität bestimmt - und Organe in situ.

1.) In allen untersuchten Zelltypen und unter allen untersuchten Stoffwechselbedingungen war der zytosolische ATP/ADP-Quotient höher als der mitochondriale ATP/ADP-Quotient. Als

Folge davon war auch das zytosolische Phosphorylierungspotential (der Konzentrationsterm RT ln $[ADP] \times [P] / [ATP]$) höher als das mitochondriale Phosphorylierungspotential. Die Differenz betrug 3 - 11 kJ/Mol,

2.) Der Gesamt-ATP/ADP-Quotient spiegelt eher den zytosolischen ATP/ADP- als den mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten wider und es besteht eine umgekehrte Beziehung zwischen dem mitochondrialen und dem zytosolischen ATP/ADP-Quotienten. Diese Beziehung wird durch den Adeninnukleotidtranslokator der inneren Mitochondrienmembran hergestellt, der einen ATP-ADP-Austausch katalysiert, wobei ATP ins Zytosol und ADP in die Mitochondrien transportiert wird.

3.) In perfundierter Leber besteht eine direkte Beziehung zwischen der Differenz zwischen mitochondrialem und zytosolischem Phosphorylierungspotential und der Atmungsaktivität, d.h., je kleiner die Differenz ist, desto größer ist der Sauerstoffverbrauch der Leber.

4.) Aus 2.) und 3.) wird geschlossen, daß im intakten Organ der Adeninnukleotidtransport bei der Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung nicht limitiert. Dies steht im Gegensatz zu einigen Befunden an isolierten Mitochondrien und Hepatozyten. Als Ursache dieses Unterschiedes wird das höhere Sauerstoffangebot isolierter Organellen im Vergleich zum intakten Organ diskutiert.

5.) In perfundierter Leber ist der zytosolische ATP/ADP-Quotient umso höher, je höher die Glykolysegeschwindigkeit ist. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den "in vitro"

Untersuchungen an Phosphofruktokinase. Unter physiologischen Bedingungen scheint demnach der zytosolische ATP/ADP-Quotient keine regulatorische Funktion in der Glykolyse auszuüben. Auf der anderen Seite ist bei Infusion von Inhibitoren der mitochondrialen ATP-Synthese der zytosolische ATP/ADP-Quotient erniedrigt und die Glykolyseaktivität stimuliert. Unter diesen Bedingungen scheint das zytosolische Adeninnukleotidsystem Einfluß auf die Glykolyse zu nehmen.

6.) Die Adenylatkinasereaktion ist im Zytosol im Gleichgewicht; in den Mitochondrien ist sie eine Größenordnung vom Reaktionsgleichgewicht entfernt.

7.) Die subzelluläre Verteilung von ATP und ADP folgt dem Membranpotential. Die Berechnung des Membranpotentials nach $\Delta\Psi = 2.3 \frac{RT}{F} \lg (ATP/ADP_{zyt.})/(ATP/ADP_{mit.})$ ergibt jedoch niedrigere Werte als erwartet, vermutlich weil der Transport von ATP^{4-} gegen ADP^{3-} zu etwa einem Viertel Protonen kompensiert, elektroneutral erfolgt.

8.) Der pH-Gradient über die Mitochondrienmembran macht in der intakten Zelle nur einen kleinen Teil der Protonmotive Force aus.

9.) Freie Fettsäuren bewirken in perfundierter Leber eine Störung des Energiestoffwechsels, erkennbar an einer erniedrigten Differenz der subzellulären Phosphorylierungspotentiale, einer Umkehrung des pH-Gradienten über die Mitochondrienmembran und einer Steigerung des Sauerstoffverbrauches der Leber. Daraus wird geschlossen, daß freie Fettsäuren einen entkoppelnden Effekt in perfundierter Leber ausüben können. Die physiologische Signifikanz dieser Beobachtung wird diskutiert.

10.) Die Ergebnisse sind mit der chemiosmotischen Hypothese vereinbar und können als Bestätigung der Hypothese in einem "Quasi in vivo System" betrachtet werden.

Literatur

1. Akerboom, T.P.M., Bookelman, H. und Tager, J.M. (1977) FEBS Lett. 74, 50 - 54.

2. Akerboom, T.P.M. (1980) Dissertation, Universität von Amsterdam.

3. Allfrey, V.G., Stern, H., Mirsky, A.E., Saetren, H. (1952) J.Gen. Physiol. 35, 529 - 578.

4. Altschuld, R.A. und Brierley, G.P. (1977) J.Mol. Cell Cardiol. 9, 875 - 896.

5. Azzone, G.F. und Massari, S. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 97 - 107.

6. Behrens, M. (1932) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 209, 59 - 74.

7. Beitner, R. (1979) TIBS 4, 228 - 230.

8. Bell, F.P. und Hubert, E.V. (1980) Comp. Biochem. Physiol. 68 C, 9 - 13.

9. Bergmeyer, H.U. (1970): Methoden der enzymatischen Analyse, 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.

10. Berry, M.N. und Friend, D.S. (1969) J. Cell. Biol. 43, 506 - 520.

11. Bloch, R. und Haberich, F.J. (1973) Dtsch. Med. Wschr. 98, 20 - 25.

12. Bode, Ch. und Klingenberg, M. (1965) Biochem. Z. 341, 271 - 299.

13. Borst, P., Loos, J.A., Christ, E.J. und Slater, E.C. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 509 - 518.

14. Brauser, B. (1968) Z. Anal. Chem. 237, 8 - 17.

15. Bücher, Th. (1955) Methods Enzymol. 1, 415 - 422.

16. Bücher, Th. & Klingenberg, M. (1958) Angew. Chemie 70, 552 - 570.

17. Bücher, Th. (1970) in: Pyridine nucleotide - dependent dehydrogenases (H. Sund ed.) Springer Verlag, Berlin, 439 - 461.

18. Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. und Sies, H. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 301 - 317.

19. Bünger, R., Haddy, F.J., Querengässer, A. und Gerlach, E. (1975) Pflüger's Arch. 353, 317 - 326.

20. Bünger, R., Sommer, O., Walter, G., Stiegler, H. und Gerlach, E. (1979) Pflüger's Arch. 380, 259 - 276.

21. Chance, B. und Williams, G.R. (1956) in: Advances in Enzymology 17 (F. Nord, ed.) Interscience, New York, 56 - 134.

22. Cohen, S.M., Ogawa, S. und Schulman, R.G. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1603 - 1607.

23. Corps, A.N., Pozzan, T., Hesketh, T.R. und Metcalfe, J. (1980) J.Biol.Chem. 255, 10566 - 10568.

24. Davis, E.J. und Lumeng, L. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2275 - 2282.

25. Davis, E.J. und Davis-van Thienen, W.I.A. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1260 - 1266.

26. Duée, E.D. und Vignais, P.V. (1965) Biochim. Biophys. Acta 107, 184 - 188.

27. Eggleston, L.V. und Hems, R. (1952) Biochem. J. 52, 156 - 160.

28. Elbers, R., Heldt, H.W., Schmucker, P., Soboll, S. und Wiese, H. (1974) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 378 - 393.

29. Erecinska, M., Stubbs, M., Myata , M., Ditre, C.M. und Wilson, D.F. (1977) Biochim. Biophys. Acta 462, 20 - 35.

30. Erecinska, M. und Wilson, D.F. (1978) TIBS 3, 219 - 223.

31. Faupel, R.P., Seitz, H.J., Tarnowski, W., Thiemann, W. und Weiss, C. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 509 - 522.

32. Greenbaum, A.L., Gumaa, K.A. und Mc Lean, P. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 617 - 663.

33. Harary, I., Hoover, F. und Farley, B. (1974) Methods Enzymol. 32, 740 - 745.

34. Heber, U. (1957) Ber. Deut. Bot. Ges. 70, 371 - 382.

35. Heldt, H.W. und Klingenberg, M. (1968) Eur. J. Biochem. 4, 1 - 8.

36. Heldt, H.W., Klingenberg, M. und Milovancev, M. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 434 - 440.

37. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. und Bücher, Th. (1959) Biochem. Z. 332, 18 - 46.

38. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. und Reim, M. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 159 - 162.

39. Holian, A., Owen, Ch. S. und Wilson, D.F. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 181, 164r- 171.

40. Hoult, D.I. und Richards, R.E. (1975) Proc. R. Soc. Lond. A 344, 311 - 340.

41. Hue, L. (1981) in: Metabolic Compartmentation (H. Sies ed.), Academic Press, New York und London, im Druck.

42. Hoek, J.B. Nicholls, D.G. und Williamson, J.R. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1458 - 1464.

43. Jungermann, K. und Katz, N. (1981) in: Metabolic Compartmentation (H.Sies ed.), Academic Press, New York und London, im Druck.

44. Kauppinen, R.A., Hiltunen, J.K. und Hassinen, I.E. (1980) FEBS Lett. 112, 272 - 276.

45. Klingenberg, M. und Slenczka, W. (1959) Biochem. Z. 331, 486 - 517.

46. Klingenberg, M. und Pfaff, E. (1966) in: Regulation of metabolic processes in mitochondria (J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello und E.C. Slater eds.) Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 180 - 201.

47. Klingenberg, M. (1975a) in: Energy transformation in biological systems, Ciba Foundation Symposium 31, Elsevier Experta Medica, North Holland, 105 - 124.

48. Klingenberg, M. (1975b) in: Energy transformation in biological systems, Ciba Foundation Symposium 31, Elsevier Experta Medica, North Holland, 23 - 40.

49. Klingenberg, M. und Rottenberg, H. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 125 - 130.

50. Kornberg, A. (1955) Methods Enzymol. 2, 670 - 672.

51. Krebs, H.A. und Henseleit, K. (1932) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66.

52. Krebs, H.A. und Veech, R.L. (1969) in: The energy level and metabolic control in mitochondria (S.Papa, J.M. Tager, E. Quagliariello und E.C. Slater eds.) Adriatica Editrice, Bari, 329 - 382.

53. Krebs, H.A. (1974) in: Regulation of Hepatic Metabolism (F. Lundquist und N. Tygstrup eds.) Munksgaard, Copenhagen, 726 - 750.

54. Küster, U., Bohnensack, R. und Kunz, W. (1976) Biochim. Biophys. Acta 440, 391 - 402.

55. Langendorff, O. (1895) Pflüger's Arch. 61, 291 - 322.

56. Lehninger, A. und Remmert, L.F. (1959) J.Biol. Chem. 234, 2459 - 2464.

57. Löffler, G. (1971) in: Biochemie und Klinik des Insulinmangels (O. Wieland und H.Mehnert eds.) Thieme Verlag, Stuttgart, 61 - 71.

58. Lemasters, J. und Sowers, A.E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1248 - 1251.

59. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

60. Lowry, O.H. und Passoneau, J.V. (1972) in: A flexible system of enzymatic analysis (O.H. Lowry und J.V. Passoneau eds.) Academic Press, New York und London, 86 - 89.

61. Lübbers, D.W. (1968) In: Biochemie des Sauerstoffs B.Hess und Hj. Staudinger eds.) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 67 - 92.

62. Markland, F.S. und Wadkins, C. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4136 - 4145.

63. Matthews, P.M. und Radda, G.K. (1981) Methods Pharmakol. 5, im Druck.

64. Matschinsky, F.M. Hintz, C.S., Reichlmeier, K., Quistorff, B. und Chance, B. (1978) in: Microenviroments and metabolic compartmentation (P.A. Srere und R.W. Estabrock eds.) Academic Press, New York, 149 - 166.

65. Mc Givan, J.D. und Klingenberg, M. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 392 - 399.

66. Mitchell, P. (1961) Nature 191, 144 - 148.

67. Mitchell, P. und Moyle, J. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 471 - 484.

68. Nicholls, D.G. (1974) Eur. J. Biochem. 50, 305 - 315.

69. La Noue, K.F und Schoolwerth, A.C. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 871 - 922.

70. La Noue, K.F., Mizani, S.M. und Klingenberg, M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 191 - 198.

71. Padan, E. und Rottenberg, H. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 431 - 437.

72. Palmieri, F., Quagliariello, E. und Klingenberg, M. (1970) Eur. J. Biochem. 17, 230 - 238.

73. Pfaff, E., Klingenberg, M., Ritt, E. und Vogell, W. (1968a) Eur. J. Biochem. 5, 222 - 232.

74. Pfaff, E. und Klingenberg, M. (1968b) Eur. J. Biochem. 6, 66 - 79.

75. Polinger, J.S. (1970) Exp. Cell. Res. 63, 78 - 82.

76. Rottenberg, H. (1975) J. Bioenerg. 7, 61 - 74.

77. Rottenberg, H. (1979) Biochim. Biophys. Acta 549, 225 - 253.

78. Santi, R. (1958) Nature 182, 257.

79. Schnitger, H., Scholz, R. und Bücher, Th. (1965) Biochem. Z. 341, 334 - 339.

80. Schwenke, W.D., Soboll, S., Seitz, H.J. und Sies, H. (1981) Biochem. J. 200, im Druck.

81. Scholz, R. und Bücher, Th. (1965) in: Control of energy metabolism (B. Chance ed.) Academic Press, New York und London, 393 - 414.

82. Scholz, R., Hansen, W. und Thurman, R.G. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 64 - 72.

83. Seitz, H.J., Müller, M.J., Krone, W. und Tarnowski, W. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 183, 647 - 663.

84. Seraydarian, K., Mommaerts, W.F.H.M. und Wallner, A. (1962) Biochim. Biophys. Acta 65, 443 - 460.

85. Sestoft, L. (1979) Scand. Clin. Lab. Invest. 39, 191 - 197.

86. Shug, A., Lerner, E., Elson, Ch. und Shrago, E. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 557 - 563.

87. Siebert, G. (1961) Biochem Z. 334, 369 - 387.

88. Siebert, G. und Humphrey, G.B. (1965) Adv. Enzymol. 27, 239 - 288.

89. Siebert, G. (1973) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 605.

90. Siekevitz, P. und Potter, V.R. (1953) J. Biol. Chem. 200, 187 - 196.

91. Sies, H. und Brauser, B. (1980) Methods Biochem. Anal. 26, 285 - 325.

92. Sies, H., Akerboom, T.P.M. und Tager, J.M. (1977a) Eur. J. Biochem. 72, 301 - 307.

93. Sies, H. (1977b) Hoppe - Seyler's Z. Physiol Chem. 358, 1021 - 1032.

94. Siess, E.A., Brocks, D.G. und Wieland, O.H. (1978) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 785 - 798.

95. Siess, E.A., Brocks, D.G. und Wieland, O. (1981) in: Metabolic Compartmentation (H.Sies ed.) Academic Press, New York und London, im Druck.

96. Söling, H.D. (1981) in: Metabolic Compartmentation (H.Sies ed.) Academic Press, New York und London, im Druck.

97. Soboll, S. (1977) Dissertation, Technische Universität, München.

98. Soboll, S., Scholz, R. und Heldt, H.W. (1978) Eur. J. Biochem. 87, 377 - 390.

99. Soboll, S., Werdan, K., Boszik, M., Müller, M., Erdmann, E. und Heldt, H.W. (1979) FEBS Lett. 100, 125 - 128.

100. Soboll, S., Elbers, R., Scholz, R. und Heldt, H.W. (1980) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 69 - 76.

101. Soboll, S., Akerboom, T.P.M., Schwenke, W.D., Haase, und Sies, H. (1980a) Biochem. J. 192, 951 - 954.

102. Soboll, S. und Bünger, R. (1980b) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 607.

103. Soboll, S. und Bünger, R. (1981) Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 125 - 132.

104. Steenbergen, Ch., DeLeeuw, G. und Williamson, J.R. (1978) J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 617 - 639.

105. Stocking, C.R. (1959) Plant Physiol. 34, 56 - 61.

106. Stubbs, M., Vignais, P.V. und Krebs, H.A. (1978) Biochem. J. 172, 333 - 342.

107. Stucki, J. (1980) Eur. J. Biochem. 109, 257 - 267.

108. Stucki, J. (1980a) Eur. J. Biochem. 109, 269 - 283.

109. Thalacker, R. und Behrens, M. (1959) Z. Naturforsch. 14b, 443 - 446.

110. Thurman, R.G. und Scholz, R. (1977) Eur. J. Biochem. 75, 13 - 21.

111. Tischler, M., Hecht, P. und Williamson, J.R. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 181, 278 - 292.

112. Van der Meer, R., Akerboom, T.P.M., Groen, A.K. und Tager, J.M. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 421 - 428.

113. Van Kampen, E.J. und Zijlstra, W.G. (1961) Clin. Chim. Acta 6, 538 - 544.

114. Veech, R.L., Lawson, J.W.R., Cornell, N.W. und Krebs, H.A. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6538 - 6547.

115. Velick, S.F. und Furfine, C. (1963) in: The Enzymes 7 (P.D. Boyer, H.Lardy und K. Myrbäck eds.) Academic Preds, New York, 244 - 273.

116. Waddell, W.J. und Butler, T.C. (1959) J. Clin. Invest. 38, 720 - 725.

117. Walter, P., Mörikofer, S. und Brawand, F. (1974) in: Regulation of Hepatic Metabolism (F.Lundquist und N. Tygstrup eds.) Munksgaard, Copenhagen, 79 - 91.

118. Williamson, J.R. (1969) in: The energy level and metabolic control in mitochondria (S. Papa, J.M. Tager, E. Quagliariello und E.C. Slater eds.) Adriatica Editrice, Bari, 385 - 400.

119. Williamson, J. R., Scholz, R. und Browning, E.T. (1969a) J. Biol. Chem. 244, 4617 - 4627.

120. Williamson, J.R. (1976) in: Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies (J.M. Tager, H. D. Söling und J.R. Williamson eds.) North-Holland publ. Company, 79 - 95.

121. Wollenberger, A., Ristau, O. und Schoffa, G. (1960) Pflüger's Arch. 270, 399 - 412.

122. Zuurendonk, P.F. und Tager, J.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 393 - 399.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Karl Werdan, der die Rattenherzfibroblasten kultivierte, PD Dr. Rolf Bünger, der die Präparation des arbeitenden Meerschweinchenherzens ausführte, und PD Dr. Hans J. Seitz, der die Rattenlebern in situ mit der Doppelbeilmethode entnahm, für ihre Kooperation und ihre Beiträge in der Diskussion.

Frau Monika Müller, Frau Sonja Gründel und Fräulein Brigitte Zimmer haben durch ihre gewissenhafte Mitarbeit wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen und seien hierfür herzlich bedankt. Ebenso möchte ich mich bei Fräulein Cornelia Stiller für die Anfertigung der Zeichnungen und Photographien und bei Frau Monika Rech und Frau Auguste Sartorius für die Anfertigung des Manuskriptes bedanken.

In Teilaspekten wurden die Experimente durch Mitarbeit von Herrn cand. med. dent. Wolfgang-Dietrich Schwenke unterstützt.

Herrn Dr. Rembert Elbers danke ich für seine wertvolle Kritik und seine Diskussionsbeiträge zu dieser Arbeit.

Durch kritisches Engagement und großzügige Förderung wurde diese Arbeit von Prof. Dr. Hans-Walter Heldt und Prof. Dr. Helmut Sies möglich gemacht. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Roland Scholz, der nicht nur fast alle Leberperfusionen ausführte und mit mir plante, sondern durch seine stete Diskussionsbereitschaft, sein Engagement für meine Arbeit und seine

wichtigen Beiträge in allen Stoffwechselfragen mir größtmögliche Unterstützung gewährt hat.

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen